



Contributo do fósforo para a eficiência simbiótica de leguminosas pratenses

Ana Cristina Martins Boucho

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em

Engenharia Agronómica

Orientadores: Prof. Catedrático Manuel Armando Valeriano Madeira

Doutora Corina Luísa Videira de Abreu Fernandes Carranca

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel Armando Valeriano Madeira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Escrito ao abrigo do novo Acordo Ortográfico

Agradecimentos

A realização desta dissertação de Mestrado contou com o apoio, empenho e encorajamento de várias pessoas, às quais estou profundamente grata. Por este motivo não poderia deixar de expressar e registar aqui os meus sinceros agradecimentos:

Em primeiro lugar, um agradecimento especial aos meus orientadores, Doutora Corina Carranca e Professor Manuel Madeira pela disponibilidade, exigência e rigor com que me orientaram. Agradeço a confiança, o permanente incentivo, a inestimável paciência e todas as preciosas críticas e sugestões que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Um agradecimento ao Instituto Superior de Agronomia (ISA, Universidade de Lisboa) pela admissão no Mestrado, e ao Conselho Diretivo do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, Oeiras) pela disponibilidade em me receber.

À empresa *Interface*, pela instalação do equipamento necessário para a destilação da água de rega e, ainda, pela oferta de uma mangueira com extensão suficiente para regar com comodidade todos os vasos do ensaio.

À empresa *Fertiprado*, por ter facultado, sem qualquer custo, as sementes inoculadas utilizadas no estudo.

À Doutora Teresa Carita, pelos ensinamentos relativos à sementeira das espécies pratenses.

Às Doutoras Paula Coelho e Paula Scotti, por me permitirem usar a estufa do INIAV e demais recursos para a realização do meu trabalho.

Ao Engenheiro Fernando Vasconcelos, pela recolha dos dados climáticos ao longo do período experimental e pela constante amabilidade e colaboração.

Ao Doutor José Semedo, pela disponibilidade na colocação e recolha dos dados dos sensores de medição da temperatura do solo e radiação PAR.

Ao Professor Luiz Gazarini, da Universidade de Évora, pelas facilidades concedidas na identificação e colheita do solo, bem como ao Mestre Paulo Marques o apoio na colheita e transporte do mesmo.

Ao *Laboratorio de Isotopos Estables, da Universidad Autonoma*, em Madrid, pela realização das análises de N total e ^{15}N no material vegetal, em particular ao Doutor Ramón Redondo, pela disponibilidade em receber as amostras e pela rapidez no envio dos resultados.

Ao Laboratório de solos do ISA-UL, pela realização das análises químicas e granulométricas do solo e teor de fósforo nos nódulos rizobianos.

Ao ex-Laboratório Químico Rebelo da Silva (LQARS), pela realização de algumas análises químicas no material vegetal e solo.

Ao Teatro Académico da Universidade de Lisboa – TUT, por todos os desafios e pelo papel fundamental na minha formação, desenvolvimento pessoal, cultural e artístico. O teatro é liberdade, descoberta e superação. Como tal, não podia deixar de agradecer a todos os elementos deste grupo, com quem tive a sorte de me surpreender e superar.

À Associação dos Estudantes do Instituto Superior de Agronomia (AEISA), que me orgulho de representar e na qual alicersei valores como a entreajuda, a cooperação e o espírito crítico. Por isso, agradeço a todos aqueles com quem tive o privilégio de aprender e partilhar o gosto pelo associativismo.

Aos meus amigos, agradeço pelo ânimo e motivação constantes ao longo deste trabalho e por todo o companheirismo e amizade.

Ao João e à sua família, pela confiança e incomensurável motivação que tão determinantes foram ao longo deste percurso. Agradeço ainda, por todo o carinho e recetividade calorosa com que sempre me recebem.

Por último, um agradecimento à minha família, em especial aos meus avós maternos a quem dedico este trabalho, por serem modelos de coragem e de amor. Ao meu avô, por ser o melhor “pai”, pela força e perseverança que o caracterizam, e à minha avó por ser a melhor “mãe”, ouvinte e conselheira. Sem a inesgotável dedicação e confiança de ambos, jamais teria aprendido o que é partilhar e agradecer.

A todos o meu muito obrigado.

Resumo

O fósforo (P) é um nutriente essencial ao crescimento das espécies pratenses e forrageiras sendo também necessário à bactéria rizobiana para obtenção de energia para a captura do N₂ durante o processo simbiótico. Para avaliar o efeito do fertilizante fosfatado nas leguminosas de pastagens melhoradas realizou-se um ensaio em vasos (64) com blocos completamente casualizados e quatro repetições, com um tratamento fatorial com quatro níveis de P (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60 e P3 = 90 kg P ha⁻¹) e três espécies pratenses (*Lolium multiflorum* L. (azevém anual), *Trifolium subterraneum* L. (trevo subterrâneo) e *Ornithopus sativus* Brot. (serradela rosa)), cultivadas como culturas estremes e em consociação. Para a avaliação da capacidade de fixação simbiótica das leguminosas recorreu-se ao método da diluição isotópica do marcador ¹⁵N. Observaram-se idênticas concentrações de P na parte aérea e na raiz das leguminosas em monocultura, mas os nódulos apresentam teores mais elevados. A dose de 60 kg P ha⁻¹ aumentou a produção de biomassa aérea, radicular e de nódulos e favoreceu a fixação do N₂. Aparentemente é a dose adequada para aplicar nas pastagens melhoradas de sequeiro, instaladas em solos ácidos e pobres em P.

Palavras-chave: Bactérias rizobianas, fixação simbiótica do N₂, fósforo recuperado, leituras SPAD, nódulos rizobianos, pastagens melhoradas.

Abstract

Phosphorus (P) is an essential nutrient for the growth of pasture and forage crops, and is necessary for *Rhizobium* to obtain the energy required to capture the atmospheric N₂ during the symbiotic process. To evaluate the effect of fertilizer P on improved pasture legumes, a controlled experiment was conducted using 64 pots. The layout was under a completely randomized block and four replications, with a factorial treatment of four levels of P (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹) and three pasture species (*Lolium multiflorum* L. (annual ryegrass), *Trifolium subterraneum* L. (subterranean clover) and *Ornithopus sativus* Brot. (pink serradella)), cultivated as sole crops and intercropped. For the evaluation of symbiotic N₂ fixing ability of legumes, the method of ¹⁵N isotopic dilution was used. Results demonstrated that P concentration was similar in shoots and roots of legume species under monocropping, but the nodules had higher P concentration. The rate of 60 kg P ha⁻¹ increased aerial, root and nodules biomass production, increasing the N₂ fixation capacity of legumes as well. Apparently, this P rate is the optimal dose for improved pastures installed in slightly acid soils with low P status.

Keywords: Fixing nodules, improved pastures, recovered phosphorus, *Rhizobium*, SPAD-readings, symbiotic N₂ fixation.

Extended abstract

Improving the nutrient use efficiency by the crops is a key goal of the twenty-first century towards a more sustainable agriculture because of the increasing pressure to reduce the negative environmental and economic impacts of using chemical fertilizers. In the improved pastures, legumes can bridge their nitrogen (N) needs by fixing the atmospheric N₂. This fixing capacity of N₂ prevents the application of mineral N fertilizers in pastures, reducing the production costs and minimizing the environmental risks which may result from potential losses of N leaching, runoff, volatilization and denitrification. In addition to the production of food for livestock, permanent pastures also contribute to the improvement of the soil physical (structure), chemical (organic matter and nutrients) and biological (increased diversity and activity of organisms) characteristics, and therefore they are recommended to improve or maintain the soil quality.

Recognizing that there are few studies on the effects of phosphorus (P) on symbiotic N₂ fixation rate and its partition in legumes, including nodules, this work aims to infer about the P role in N₂ fixation efficiency and the extent to which the nutrient has been recovered by the system (soil + whole plant), in particular for the new pasture legume (pink serradella).

The experimental layout was under a completely randomized block and four replications, with a factorial treatment of four levels of P (P₀ = 0, P₁ = 30, P₂ = 60 and P₃ = 90 kg P ha⁻¹) and three pasture species (*Lolium multiflorum* L. (annual ryegrass), *Trifolium subterraneum* L. (subterranean clover) and *Ornithopus sativus* Brot. (serradella pink)), cultivated as sole crops or in an intercropped system. To assess the symbiotic N₂ fixing capacity of legumes, the method of ¹⁵N isotopic dilution was used. The experiment was run in 64 pots, under controlled air temperature, humidity and radiation conditions, for 103 days of plant growth.

Results demonstrated that P in legume species was in similar concentrations in the aerial biomass and roots (0, 26 g P 200 g⁻¹ DW) when cropped as monoculture, but the nodules presented a higher concentration (0, 25 - 0, 41 g P 100 g⁻¹ DW). Legumes were more responsive to P fertilization, being therefore more demanding for P than grass species. The rate of 60 kg P ha⁻¹ increased the production of aerial, root and nodules biomass and favored the capture of N₂ atmospheric. Apparently this P rate is adequate for improved pastures cultivated in dry land with acid and poor P soils.

Keywords: Fixing nodules, improved pastures, recovered phosphorus, *Rhizobium*, SPAD-readings, symbiotic N₂ fixation.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Extended abstract	vii
Lista de quadros.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE	4
2.1. Importância das pastagens em Portugal	4
2.1.1. As pastagens permanentes melhoradas.....	4
2.1.2. Espécies pratenses em estudo	5
2.2. A fixação simbiótica do azoto (N ₂)	8
2.2.1. Mecanismo de atração hospedeiro-rizóbio	8
2.2.2. Alguns aspetos relativos ao processo de fixação do N ₂	9
2.3. Avaliação da fixação simbiótica do N ₂	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Local do ensaio	16
3.2. O solo.....	18
3.3. Delineamento experimental	18
3.4. Medições e amostragens	22
3.5. Métodos analíticos	24
Plantas.....	24
Solo.....	25
3.6. Cálculos e análise estatística dos resultados.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Leituras SPAD.....	27
4.2. Biomassa das plantas	31
Biomassa aérea.....	32
Biomassa radicular	35
Nódulos rizobianos	36

4.3. Concentração de P na biomassa das plantas	39
Biomassa aérea e radicular	39
Nódulos rizobianos	42
4.4. Fixação simbiótica do N ₂ pelas leguminosas	44
Excesso de átomos ¹⁵ N nas plantas	44
Teor de N ₂ fixado	44
Relação entre as leituras SPAD e os teores de N ₂ fixado	49
4.5. Teor de P extraível no solo	50
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	62

Lista de quadros

- Quadro 1.** Valores da composição granulométrica, do complexo de troca e do fósforo (P) e potássio (K) extraíveis nas amostras do solo (0 – 20 cm) da Herdade da Mitra utilizado no ensaio 18
- Quadro 2.** Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) das leituras SPAD determinadas nas três espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) em duas datas do ciclo vegetativo (07/12/2015 e 13/01/2016), em ambos os sistemas culturais e em resposta ao tratamento fosfatado (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 28
- Quadro 3.** Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) do peso seco (g planta⁻¹ (PS)) da biomassa aérea e radicular (nodulada, no caso das leguminosas) (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 32
- Quadro 4.** Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) do número, biomassa (mg planta⁻¹ (PS)), teor de P total (g P kg⁻¹ PS), P exportado (mg P planta⁻¹ (PS)) e teor de N total (g N kg⁻¹ PS), relação N/P, excesso de átomos de ¹⁵N (%), %Nda e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nos nódulos das leguminosas cultivadas em ambos os sistemas culturais (monocultura e consociação), por efeito do tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 38
- Quadro 5.** Comparação de médias e resultados da Análise de Variância (ANOVA) da concentração total de P e N (g kg⁻¹ PS), e respetiva relação, para ambos os órgãos da planta (parte aérea e raiz não nodulada) e teores de P exportado (mg P planta⁻¹ (PS)), enriquecimento em ¹⁵N (%enriq.¹⁵N) e excesso de átomos de ¹⁵N (%exc.át.¹⁵N) nas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa), em ambos os sistemas culturais (monocultura e consociação) e, em resposta ao tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 41
- Quadro 6.** Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) dos teores de N derivado da atmosfera (%Nda) e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) pelas leguminosas pratenses, em ambos os órgãos das plantas (parte aérea e raiz sem nódulos), quando cultivadas como culturas estremes ou em consociação e em resposta ao tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 45
- Quadro 7.** Comparação de médias e resultados da Análise de Variância (ANOVA) dos teores de P (mg P kg⁻¹) no solo cultivado com três espécies pratenses (azevém, trevo subterrâneo, serradela rosa) em dois sistemas culturais (monocultura e consociação) e em resposta ao tratamento fosfatado (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹) 52
- Quadro 8.** Quantidade de P recuperado do fertilizante (P_{fert.recuperado} (%)) no solo, na planta completa e no sistema (solo + planta) e P não recuperado no sistema (solo + planta) (%) pelas espécies pratenses (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), quando cultivadas em monocultura e consociadas, sob o efeito do tratamento fosfatado (tratamento: 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹) 54

Lista de figuras

- Fig. 1.** Exemplo de nódulos indeterminados nas plantas de trevo subterrâneo (à esquerda) e serradela rosa (à direita). 10
- Fig. 2.** Evolução da temperatura (°C) do ar na estufa do INIAV (Oeiras), durante o período experimental (16 semanas). 16
- Fig. 3.** Evolução da temperatura (°C) no solo, durante o período experimental (da 2ª à 16ª semana). 17
- Fig. 4.** Evolução da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) na estufa do INIAV (Oeiras), ao longo do período experimental (da 4ª à 16ª semana). 17
- Figura 5.** Representação esquemática da disposição dos vasos na bancada por espécies (S1 = *Lolium multiflorum* L.; S2 = *Trifolium subterraneum* L.; S3 = *Ornithopus sativus* Brot.), S4 = Consociação), repetições (I – IV) e teores de P (P0 = branco; P1 = amarelo; P2 = verde; P3 = azul). 21
- Fig. 6.** Leituras SPAD com o medidor de clorofila Minolta SPAD-502. 23
- Fig. 7.** Início da floração da serradela rosa (*Ornithopus sativus* Brot.). 24
- Fig. 8.** Resultado da interação entre as leituras SPAD obtidas para as espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa), os sistemas culturais (cultura estreme e consociação) e o tratamento fosfatado, para o efeito médio das datas de amostragem; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 29
- Fig. 9.** Regressão logarítmica entre as leituras SPAD e a concentração de N total na biomassa aérea (g N kg^{-1} PS) para cada espécie pratense e sistema cultural ($R^2 = 0,39$; $r = 0,62$; $p < 0,001$; $n = 80$). 30
- Fig. 10.** Resultado da interação da biomassa aérea (g PS planta^{-1}) produzida pelas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) por efeito dos dois sistemas culturais (cultura estreme e consociação) e tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha^{-1} ; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 33
- Fig. 11.** Curvas polinomiais da produção de biomassa aérea das leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), em monocultura, e em resposta ao tratamento fosfatado. 34
- Fig. 12.** Interação da biomassa radicular (g PS planta^{-1}) produzida pelas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) em ambos os sistemas culturais (cultura estreme e consociação), por efeito médio do tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha^{-1}); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 35
- Fig. 13.** Efeito do tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha^{-1}) no número e peso seco (mg PS planta^{-1}) dos nódulos produzidos pelo trevo

subterrâneo e serradela rosa quando cultivados como culturas estromes e em consociação; (barras = peso seco; linha = nº nódulos); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni

..... 37

Fig. 14. Efeito da interação das espécies pratenses e sistemas culturais (azevém anual (A), trevo subterrâneo (T) e serradela rosa (S)) em monocultura (M) e consociação (C) nos teores de P total (g P kg^{-1} PS) da parte aérea e raiz (não nodulada) das espécies pratenses, na ausência de resposta ao tratamento fosfatado; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 40

Fig. 15. Ajustamento de uma curva polinomial aos resultados da biomassa aérea (g PS planta^{-1}) e a concentração de P (g P kg^{-1} PS) nas espécies pratenses, em monocultura e consociação, em resposta ao tratamento fosfatado ($R^2 = 0,35$, $r = 0,59$, $p < 0,001$, $n = 80$). 42

Fig. 16. Teores médios de P total (g P kg^{-1} PS) nos nódulos rizobianos das leguminosas (trevo subterrâneo e serradela rosa) cultivadas em monocultura e consociação e em resposta ao tratamento fosfatado ($P_0 = 0$, $P_1 = 30$, $P_2 = 60$, $P_3 = 90$ kg P ha^{-1}); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 43

Fig. 17. Teores de N_2 fixado (mg N planta^{-1} (PS)) na biomassa aérea e radicular por efeito da interação entre as leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), o sistema cultural (monocultura e consociação) e o tratamento fosfatado ($P_0 = 0$, $P_1 = 30$, $P_2 = 60$, $P_3 = 90$ kg P ha^{-1}); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 46

Fig. 18. Teores de N_2 fixado e de P exportado (mg planta^{-1} (PS)) nos nódulos rizobianos das leguminosas (trevo subterrâneo e serradela rosa) em resposta ao tratamento fosfatado ($P_0 = 0$, $P_1 = 30$, $P_2 = 60$, $P_3 = 90$ kg P ha^{-1}) assumindo o efeito médio do sistema cultural (monocultura e consociação); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni. 48

Fig. 19. Partição dos teores de N_2 fixado (mg N planta^{-1} (PS)) nos diferentes órgãos (biomassa aérea, biomassa radicular e nódulos rizobianos) das leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), em monocultura e em consociação, assumindo o efeito médio do tratamento fosfatado. 49

Fig. 20. Regressão linear entre as leituras SPAD e os teores de N_2 fixado (mg N planta^{-1} (PS)) nas leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa) cultivadas em monocultura e consociação ($R^2 = 0,28$, $r = 0,53$, $p < 0,001$, $n = 48$). 50

Fig. 21. Relação polinomial entre o tratamento fosfatado (kg P ha^{-1}) e o teor de P extraível no solo (mg P kg^{-1}) ($R^2 = 0,86$, $r = 0,93$, $p < 0,001$, $n = 64$). 53

Lista de abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato

ADP – Adenosina difosfato

C – Carbono

Ca²⁺ – Ião cálcio

CE – Condutividade elétrica

cmol – Centimole

CO₂ – Dióxido de carbono

C_{org} – Carbono orgânico

DAS – Dias Após Sementeira

DW – *Dry weight* (Peso seco)

e- – Eletrões

FAO – *Food and Agricultural Organization of the United Nations*

Fe – Ferro

g – grama

h – Hora

H – Hidrogénio

K⁺ – Ião potássio

LQARS – Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva

m – metro

min – Minuto

mm – milímetro

Mg²⁺ – Ião magnésio

MLG – Modelo Linear Generalizado

MO – Matéria orgânica

n - Número

N – Azoto

N₂ – Azoto molecular

¹⁵N – Isótopo estável do azoto com massa molecular 15

^{14}N – Isótopo estável do azoto com massa molecular 14

Na^+ – Ião sódio

Nda – Azoto derivado da atmosfera

NH_3 – Amoníaco

NH_4^+ – Ião amónio

NO_3^- – Ião nitrato

p - Probabilidade

P – Fósforo

PAR – *Photosynthetic Active Radiation* (Radiação Fotossinteticamente Ativa)

Pext – Fósforo extraível no solo

Pexp – Fósforo exportado na planta

pH – Potencial de hidrogénio

PS – Peso seco

PV – Peso verde

kg – quilograma

r – Coeficiente de correlação

R^2 – Coeficiente de determinação

s – Segundo

SAU – Superfície Agrícola Útil

SPAD – *Soil Plant Analysis Development*

μmol – Micromole

$^{\circ}\text{C}$ – Grau centígrado

% - Percentagem

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável representa atualmente um dos maiores desafios para a Humanidade. Ao longo dos anos, o modelo de desenvolvimento evoluiu da agricultura de subsistência para uma exploração agroindustrial intensa (Revolução Industrial), com a aplicação de tecnologias modernas (adubos, fitofármacos, maquinaria diversa) e, em muitos casos, com ocupação e utilização insustentável dos recursos naturais, colocando a sua viabilidade em risco para as gerações vindouras.

Nas regiões Mediterrânicas, a escassez de água e a erosão dos solos são os principais fatores limitantes da sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Pérez et al., 2016). A compactação do solo e consequente deterioração da sua estrutura, e a diminuição do teor de matéria orgânica aliada à erosão e perda de nutrientes, nomeadamente o azoto (N) e o fósforo (P) limitam o crescimento vegetal (Martins et al., 2010; Rodrigues et al., 2015). Além disso, os solos ácidos podem dificultar o estabelecimento de relações simbióticas entre as leguminosas e as bactérias do solo, levando à diminuição da fixação simbiótica do N_2 atmosférico (Carranca, 2013; Pérez et al., 2016).

Na produção vegetal, o N é o nutriente que, geralmente, mais limita a produção, devido às transformações que pode sofrer no solo e à grande mobilidade (Carranca, 2000). Embora seja abundante na atmosfera (78%), o facto de as necessidades azotadas da maioria das culturas serem elevadas faz deste nutriente um fator limitante da produção.

Atualmente, e sobretudo devido ao impacte ambiental negativo resultante da aplicação de grandes quantidades de adubos azotados, há um renovado interesse na utilização de culturas capazes de usar o N_2 atmosférico para satisfazer as suas necessidades azotadas, através da associação simbiótica com bactérias fixadoras desse N.

Este processo biológico é economicamente atrativo e ecologicamente conveniente, minimizando o uso dos adubos azotados. Para que a fixação simbiótica se processe, a planta hospedeira, normalmente uma leguminosa, tem de disponibilizar produtos fotoassimilados e nutrientes à bactéria associada fixadora do N_2 . Segundo Graham & Vance (2000) e Carranca (2013), cerca de 80% do N_2 biologicamente fixado provém da simbiose.

Nas pastagens melhoradas, as leguminosas podem fixar entre 75 e 200 kg N ha^{-1} em regime de sequeiro e entre 150 e 500 kg N ha^{-1} em regadio (Zahran, 1999).

Assim, uma aposta em pastagens melhoradas, ricas em leguminosas, permite reduzir o *input* de adubos azotados ao sistema e consequentemente, diminuir os seus impactes negativos, quer ambientais, quer económicos.

Para além do N, o P é também um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas leguminosas fixadoras do N₂ (Graham & Vance, 2000; De Varennes, 2003; Carranca, 2013), aparentemente essencial ao funcionamento dos bacteróides no interior dos nódulos rizobianos (Al-Niemi et al., 1997), mas também para a atividade fotossintética. Baixos níveis de P disponível no solo reduzem a taxa fotossintética e, consequentemente, a produção de biomassa aérea, limitando, deste modo, a disponibilidade de carbono (C) para o bacteróide e por sua vez, diminuindo a taxa de fixação do N₂ (Al-Niemi et al., 1997).

A principal matéria-prima utilizada na produção de quase todos os adubos fosfatados é a rocha fosfatada, da qual Marrocos, o Saara Ocidental e a China, representam 2/3 das reservas terrestres mundiais (Fixen, 2009, Horta et al., 2015). Cordell et al. (2009) consideram que estas reservas podem esgotar-se durante o presente século. A exploração desses recursos naturais atingirá um valor máximo em 2030, entrando depois em declínio. Fixen (2009) recorda também que as matérias-primas necessárias para a produção dos adubos fosfatados são recursos naturais finitos, não renováveis à escala humana, pelo que devem ser motivo de uma gestão mais sustentável. Além disso, a produção de adubos fosfatados exige consumo de energia derivada dos combustíveis fósseis pelo que a otimização do uso destes fertilizantes na agricultura deverá ser uma prática corrente e se possível, com recurso a microrganismos biofertilizantes solubilizadores do P indisponível no solo e uso de resíduos orgânicos fornecedores de P.

Assim, a otimização do uso dos adubos fosfatados pelas leguminosas em geral, e das pratenses em particular, é indispensável para o sucesso da fixação simbiótica e consequentemente, para uma redução dos custos de produção das pastagens e aumento da resiliência do sistema produtivo.

Neste contexto, foi desenvolvido um estudo para avaliação do efeito do P na eficiência da fixação simbiótica do N₂ por duas leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), como culturas estremes e em consociação com o azevém anual. Procurou avaliar-se a dotação de P a recomendar para pastagens melhoradas formadas pelas espécies pratenses estudadas e semeadas em solos de textura ligeira, ligeiramente ácidos e pobres em P.

O ensaio foi realizado em vasos, em ambiente controlado, usando um delineamento experimental com três espécies pratenses anuais cultivadas como

culturas estremes e em consociação e um tratamento fatorial com quatro níveis de P e quatro repetições. O método de diluição isotópica do ^{15}N foi usado para quantificar o N_2 fixado nas simbioses das leguminosas, em resposta ao P aplicado.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Importância das pastagens em Portugal

As pastagens são um conjunto de diversas plantas, incluindo leguminosas, cuja produção (biomassa aérea) é utilizada para a alimentação de herbívoros dentre os quais se destacam os ruminantes (Moreira, 2002). O leite e a carne de vaca correspondem à primeira e terceira *commodities* agrícolas, respetivamente, em todo o mundo (Lindström et al., 2010).

Nos sistemas de produção animal com ruminantes, o objetivo principal das pastagens é o fornecimento de alimento. No entanto, as pastagens desempenham também um papel muito importante na sustentabilidade dos solos, visto que as pastagens permanentes (≥ 5 anos) (Regulamento (CE) nº 796/2004; Teixeira et al., 2011) mantêm um coberto vegetal “duradouro”, protegendo os solos da erosão e permitindo a reciclagem de nutrientes através do pastoreio direto e da decomposição do material vegetal remanescente e rizodepósitos (Freixial & Barros, 2012; Carranca, 2013). Contribuem ainda para o sequestro do C e, conseqüentemente, para a redução da concentração do dióxido de C (CO₂) na atmosfera. Estando envolvidas na produção de alimentos para o gado, as pastagens permanentes promovem, ainda, a fixação da população rural e o combate à desertificação, dinamizando as atividades agrícolas e o comércio local. Assim, as pastagens, em especial as permanentes, tornam-se fundamentais para o aproveitamento e valorização de áreas com menor aptidão para outro tipo de atividade. As pastagens de curta duração podem ser integradas em sistemas de rotação cultural, o que do ponto de vista agrícola e ambiental é igualmente importante (Freixial & Barros, 2012; Carranca, 2013).

As pastagens permanentes representam cerca de metade da Superfície Agrícola Útil (SAU), onde a terra arável constitui menos de 1/3 e as culturas permanentes representam 20%. O predomínio das pastagens em detrimento de terrenos aráveis é o resultado de um longo processo que se tornou visível nos últimos quinze anos visando o controlo da erosão dos solos e o sequestro do C (Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral, 2015).

2.1.1. As pastagens permanentes melhoradas

As pastagens permanentes, melhoradas, diferem das pastagens convencionais, mistas, por se basearem na diversidade e complementaridade

funcional das espécies pratenses (leguminosas e gramíneas) visando o aumento da resiliência do sistema em diferentes condições ambientais e a melhoria da produção vegetal (Freixial & Barros, 2012; Raimundo et al., 2015). Nas pastagens mistas, a proporção de leguminosas recomendada na mistura de sementes era de 1:1 (leguminosas : gramíneas) (Carranca et al., 1999).

Numa pastagem melhorada, rica em leguminosas, estas têm a capacidade de, em associação com o rizóbio, fixarem elevadas quantidades de N, entre os 75 e 200 kg N ha⁻¹ em sequeiro, e entre 150 e 500 kg ha⁻¹ em regadio (Freixial & Barros, 2012). Isto acontece porque as plantas não leguminosas associadas são mais eficientes na absorção do N disponível no solo (devido a um sistema radicular mais desenvolvido), obrigando a planta leguminosa a capturar o N₂ da atmosfera, porque em simbiose possui essa capacidade. O azoto do solo é, assim, consumido pelas plantas não leguminosas, evitando que aí se acumule.

Estas pastagens melhoradas, com grande diversidade de espécies/cultivares, apresentam sistemas radiculares variados, tanto na forma, como em profundidade, densidade e eficiência do uso da água e nutrientes contribuindo, deste modo, para a melhoria das características físicas, químicas e biológicas dos solos, designadamente, a estrutura e a fertilidade (Freixial & Barros, 2012; Gómez-Rey et al., 2012).

Em resumo, as leguminosas nas pastagens têm uma importância considerável uma vez que a fixação simbiótica do N₂ elimina a necessidade de adubação azotada do sistema, e que de outro modo teria de ser realizada. Por outro lado, por contribuírem para a melhoria das características físicas (estrutura), químicas (matéria orgânica e nutrientes) e biológicas (aumento da diversidade e atividade microbiana) do solo, as pastagens melhoradas devem ser usadas como plantas melhoradoras do sistema (Fernandes & Reis, 2001; Gómez-Rey et al., 2012). Ambientalmente, contribuem para o sequestro do C no solo.

2.1.2. Espécies pratenses em estudo

São várias as espécies/cultivares usadas nas pastagens melhoradas em Portugal. Recorre-se, frequentemente, ao azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) (Lopes et al., 2006) e ao trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L.). O uso da serradela (*Ornithopus* spp.) não é comum, muito em especial a serradela rosa (*O. sativus* Brot.) pelo que a sua inclusão neste estudo é importante e original, permitindo a avaliação das suas características e potencialidades no País.

De seguida resumem-se algumas características das espécies pratenses em estudo.

Azevém anual (*Lolium multiflorum* L.)

O azevém anual (*Lolium multiflorum* L.) é uma gramínea com boa capacidade produtiva e muito apetecível para os animais. É uma planta anual, com maior interesse para pastagens de sequeiro, em condições Mediterrânicas, com verões quentes e secos (Freixial & Barros, 2012).

A escolha desta gramínea para o presente trabalho deveu-se, não apenas, à sua grande utilização nas pastagens melhoradas mas também para ser usada como cultura testemunha para o método da diluição isotópica do ^{15}N , para determinação da eficiência simbiótica das leguminosas em estudo (Carranca, 2000). Foi escolhida para testemunha por ter um ciclo cultural semelhante ao das presentes leguminosas e extrair N do solo a um ritmo semelhante ao das referidas leguminosas, se não utilizassem o N_2 atmosférico.

Em regiões climáticas favoráveis à cultura do azevém anual, como sejam a região de Entre Douro e Minho, é possível atingir produções da ordem das 60 toneladas de biomassa aérea por hectare, correspondente a cerca de 12 toneladas de matéria seca (MS) por hectare (Lopes & Fernandes, 2006).

Trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L.)

O trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L.) é uma leguminosa anual de porte prostrado, que vegeta espontaneamente na região Mediterrânica (Dodd & Orr, 1995). É, assim, considerada a leguminosa anual pratense mais interessante para pastagens melhoradas de sequeiro em zonas Mediterrânicas (Freixial & Barros, 2012). Tem uma boa produção invernal ($2000 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) (Volaire et al., 1992) e uma elevada capacidade para suportar um pastoreio médio a intensivo, preferencialmente, o pastoreio rotacional, devido, especialmente, ao seu porte prostrado (Dodd & Orr, 1995; Gonçalves, 2015). Em condições ambientais favoráveis pode produzir até 4 t MS ha^{-1} (Fontaneli et al., 2012). Farinha et al. (1998) e Carranca et al. (2015) estimaram produções de trevo subterrâneo no Alentejo (condições de sequeiro) entre os $900 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ e $1700 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), com dois cortes no ano.

O trevo subterrâneo possui um período de floração muito curto, devendo-se aliviar ou suspender o pastoreio nessa época. Outra particularidade desta leguminosa é a sua capacidade de ressementeira natural (Carranca et al., 2015), a qual é favorecida pelo enterramento dos glomérulos no solo. Os glomérulos correspondem às infrutescências do trevo subterrâneo, contendo os frutos e sementes no seu interior, sendo normalmente enterrados no solo até que estejam reunidas as condições ambientais favoráveis para germinarem (Aguilar et al., 2013). Por este motivo, esta leguminosa está bem adaptada às condições de sequeiro da região Mediterrânica.

Serradela rosa (*Ornithopus sativus* Brot.)

A serradela rosa (*Ornithopus sativus* Brot.) é uma leguminosa anual, bem adaptada às regiões de clima Mediterrânico (Fernandes & Reis, 2001). Possui um padrão de crescimento e desenvolvimento muito semelhante ao do trevo subterrâneo (Freixial & Barros, 2012), mas com uma precocidade variável entre os 108 e 143 dias até à floração (Ovalle et al., 2006). A sua adaptação ao clima Mediterrânico provém da capacidade da planta para se regenerar anualmente, após o verão, com a dormência das sementes no solo (formadas na primavera) (Gonçalves, 2015) e porque apresenta um sistema radicular muito profundo, resistente ao défice hídrico.

A leguminosa possui um porte ereto, sendo por isso mais adequada para corte do que para pastoreio direto. Provavelmente esta é a razão por que não tem sido incluída nas misturas para pastagens permanentes. É uma espécie também tolerante ao frio, mas não existem registos sobre a amplitude térmica preferencial (Ovalle et al., 2006). Se a primavera for chuvosa, é possível a realização de um segundo corte após a floração (Tavares, 2014).

A serradela rosa apresenta um elevado valor nutritivo, sendo rica em proteína com elevada digestibilidade, que diminui com a maturação da planta (Gonçalves, 2015).

Esta leguminosa caracteriza-se pela sua boa adaptação a solos de baixa fertilidade, arenosos e ácidos, sendo sensível a solos compactados e com má drenagem interna (Fernandes & Reis, 2001). A produção de biomassa aérea (em peso seco por hectare) é superior à do trevo subterrâneo (Freixial & Barros, 2012). Devido ao seu sistema radical profundo, a serradela rosa tem maior eficiência no uso da água e nutrientes, em especial o P e o potássio (K) do que o trevo subterrâneo (Ovalle et al., 2006; Gonçalves, 2015), com cerca de metade das necessidades em P que o trevo subterrâneo (Bolland & Paynter, 1992; Gonçalves, 2015).

Perdigão (2011) verificou que a serradela amarela (*Ornithopus compressus* L.) pode atingir níveis de produção de biomassa da ordem dos 7179 kg MS ha⁻¹, para as condições climáticas de Vila Real (14 °C e 1131 mm de temperatura e pluviosidade médias anuais, respetivamente), o que não difere muito do que Iglesias & Lloveras (2000) verificaram para a serradela rosa (4000 a 6000 kg MS ha⁻¹) em condições climáticas do noroeste de Espanha (18,6 °C e 1505 mm de temperatura e pluviosidade médias anuais, respetivamente).

2.2. A fixação simbiótica do azoto (N₂)

Entende-se por fixação simbiótica a associação mutualista, benéfica, entre uma planta hospedeira (geralmente leguminosa) e uma bactéria da Ordem *Rhizobiales*. Estas bactérias do solo fixam o N₂ atmosférico depois de se estabelecerem no interior do nódulo radicular da planta leguminosa infetada (Carranca, 2013).

2.2.1. Mecanismo de atração hospedeiro-rizóbio

Na rizosfera, os flavonóides exsudados pela raiz das leguminosas podem atrair a bactéria rizobiana no solo e estimular a expressão dos genes da nodulação (*nod genes*) do rizóbio. Estes genes codificam umas proteínas designadas por fatores *nod factors* que são excretados pela bactéria e atuam como moléculas sinalizadoras (Carranca, 2013). Nesta etapa, a bactéria rizobiana pode reconhecer os sinais emitidos pela planta leguminosa e vai colonizá-la, infetando as raízes da planta e formando os nódulos (rizobianos). Esta associação simbiótica é muito específica porque, em geral, cada rizóbio só reconhece os flavonóides libertados pelo hospedeiro compatível (De Varennes, 2003; Carranca, 2013). Apesar da fixação simbiótica do N₂ ser um processo específico, há leguminosas que podem formar nodulação rizobiana com várias estirpes de bactérias rizobianas e, neste caso, designam-se por leguminosas promíscuas (Howieson & Ballard, 2004; Carranca, 2013). A eficiência simbiótica nestes casos é mais reduzida (menor captura do N₂ atmosférico) do que quando a simbiose se dá entre organismos específicos (Carranca, 2013).

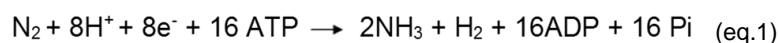
2.2.2. Alguns aspetos relativos ao processo de fixação do N₂

O rizóbio infeta a planta, normalmente nas raízes jovens, penetra as células corticais dissolvendo a membrana citoplasmática e provoca uma deformação e encurvamento dos pêlos radiculares (Fagan et al., 2007; Carranca, 2013; Fernandes & Rodrigues, 2014).

As bactérias instalam-se no citoplasma das células do córtex ficando rodeadas por uma membrana sintetizada pela planta, a membrana peribacteróide (De Varennes, 2003). Aí transformam-se em bacteróides, cerca de quarenta vezes maiores que a bactéria original e tomam a forma de bastonetes (Carranca, 2013). Estes bacteróides, desprovidos de parede celular, vão preencher a célula cortical quase totalmente e é neste momento que se inicia a captura do N₂ atmosférico. De acordo com De Varennes (2003), em geral na primeira semana após a germinação das plantas leguminosas, os bacteróides começam a fixar o N₂ atmosférico. Os bacteróides contêm a enzima nitrogenase, necessária para mediar o processo de fixação do N₂.

A fixação simbiótica do N₂ atmosférico consiste na captura de N₂ pelo bacteróide no interior do nódulo rizobiano e sua redução a amoníaco (NH₃), onde é convertido a amónio (NH₄⁺) e posteriormente assimilado dando origem, fundamentalmente, às formas de amido e ureído (Carranca, 2013).

Para que a reação ocorra, é necessário que exista um transporte de eletrões mediado por moléculas aptas a realizá-lo. A enzima nitrogenase, responsável por catalisar esta reação é formada por duas unidades proteicas, componente I com ferro (Fe) e componente II com Fe e molibdénio (Mo), ambas capazes de transportar eletrões (Fagan et al., 2007; Carranca, 2013). A conversão do N₂ em NH₃ é representada pela seguinte equação:



Esta reação requer muita energia: no mínimo 10 moléculas de ATP (adenosina trifosfato-molécula, constituída por adenosina e três grupos fosfato, e que tem como função o armazenamento de energia) (Fagan et al., 2007), por cada molécula de N₂ capturado e reduzido a duas moléculas de NH₃. Em geral, são 16 as moléculas de ATP necessárias para a reação. No caso de condições desfavoráveis, como sejam as baixas temperaturas ou um mau arejamento do solo, o número de ATPs pode ser superior. Em geral, nos ecossistemas naturais, o consumo de ATP varia entre as 10 e 30 moléculas por cada molécula de N₂ reduzida (De Varennes, 2003). Isto explica por que motivo as leguminosas noduladas precisam de maiores quantidades de P do que

as mesmas plantas não noduladas, ou mesmo, que as plantas não leguminosas (Graham & Vance, 2000; Carranca, 2013).

No processo simbiótico, a planta hospedeira fornece produtos fotoassimilados aos bacteróides para que, através do C disponível, obtenham a energia indispensável à captura do N_2 . Estima-se que 2,4 - 7,0 g C são necessários para a fixação de 1 g de N_2 (De Varennes, 2003).

O bacteróide, no nódulo, necessita de oxigénio (O_2) para capturar o N_2 . No entanto, a enzima nitrogenase é inibida pela presença do O_2 (Fagan et al., 2007; Carranca, 2013). Por este motivo, nos nódulos existe uma proteína designada (leg) hemoglobina que contém um grupo heme que assegura o transporte do O_2 para os bacteróides nas quantidades suficientes, sem inibir a atividade da nitrogenase (Fagan et al., 2007; Carranca, 2013). Esta proteína é avermelhada, de modo que, quando o interior do nódulo apresenta esta coloração significa que os bacteróides estão ativos, fixando o N_2 atmosférico (Carranca, 2013).

Nódulos determinados e indeterminados

Dependendo da sua origem, podemos encontrar dois tipos de nódulos rizobianos: indeterminados e determinados, em função da sua origem no córtex interno ou externo, respetivamente (Carranca, 2013). Ambos os tipos de nódulos apresentam uma estrutura anatómica distinta e diferem no modo como se comportam os bacteróides no interior do nódulo em formação (Carranca, 2013).



Fig. 1. Exemplo de nódulos indeterminados nas plantas de trevo subterrâneo (à esquerda) e serradela rosa (à direita).

Nos nódulos indeterminados (Fig.1) que ocorrem, por exemplo, em plantas dos géneros *Trifolium* (trevo) (Junior et al., 2010) e *Ornithopus* (serradela) (Derylo et al., 1995), são as células do córtex interior que reintroduzem o bacteróide no ciclo celular (Junior et al., 2010). Estes nódulos possuem um meristema permanente, que lhes confere uma forma cilíndrica, devido à divisão celular durante o seu crescimento. Nestes nódulos, é na zona central que se realiza a fixação simbiótica (Junior et al., 2010; Carranca, 2013).

Nos nódulos determinados que ocorrem, por exemplo, no *Phaseolus* (feijoeiro) e na *Glycine* (soja) não há a formação de um meristema permanente (Junior et al., 2010; Carranca, 2013). Assim, o crescimento do nódulo baseia-se na sua expansão, em vez da divisão celular. Por esta razão, estes nódulos apresentam uma morfologia esférica, em vez de cilíndrica (Carranca, 2013).

Principais fatores que afetam a fixação simbiótica

De um modo geral, os fatores que afetam o desenvolvimento da planta também afetam a bactéria no solo. A presença de bactérias rizobianas específicas para a leguminosa presente, a intensidade luminosa (radiação solar), a temperatura do ar e do solo, a acidez do solo, o défice ou excesso de água no solo, o défice de nutrientes no solo, o excesso de N no solo, a presença de metais pesados, e o aparecimento de pragas ou doenças na planta são fatores que afetam a fixação simbiótica (De Varennes, 2003; Figueiredo et al., 2008; Carranca, 2013). A baixa fertilidade do solo, nomeadamente, um pH desfavorável (< 5,0), a carência nutritiva (P, Mo, K), níveis elevados de N, metais pesados ou de outros contaminantes têm influência direta e negativa na simbiose rizobiana (Figueiredo et al., 2008; Carranca, 2013; Pérez et al., 2016).

Segundo Weisany et al. (2013), a deficiência nutritiva pode influenciar a fixação simbiótica do N₂ em diferentes fases do processo simbiótico: na infeção das raízes, no desenvolvimento dos nódulos, ou durante o crescimento da planta hospedeira.

Presença de bactérias específicas no solo

É importante não esquecer que a seleção das leguminosas deve ser acompanhada da seleção dos respetivos microssimbiontes eficientes na fixação simbiótica (Haque et al., 1985; Berbara et al., 2006; Carranca, 2013). Quando no solo não existam bactérias específicas em quantidade e diversidade suficientes para assegurar uma boa eficiência simbiótica deve recorrer-se ao processo de inoculação

das sementes ou do solo (Hungria et al., 2001; Gonzaga, 2002; Lindström et al., 2010; Carranca, 2013). No caso das pastagens, as sementes, muito pequenas, são, geralmente, comercializadas já inoculadas (Lindström et al., 2010; Carranca, 2013).

Capacidade fotossintética da planta

A fixação simbiótica do N_2 depende, diretamente, do desenvolvimento da planta. Tendo em conta que o rizóbio necessita de um fornecimento contínuo de glúcidos para produzir a energia necessária à captura do N_2 , a taxa de fotossíntese da planta vai influenciar a atividade do bacteróide no nódulo (De Varennes, 2003). Deste modo, para otimizar a simbiose é necessário que a planta leguminosa realize a fotossíntese de forma adequada.

Um corte da biomassa aérea, como seja o resultado do pastoreio direto numa pastagem, ou corte nas forragens, provoca uma redução substancial da taxa fotossintética total da pastagem/forragem, reduzindo substancialmente a fixação do N_2 . Por este motivo, o pastoreio direto deve ter uma gestão rotacional adequada (Carranca, 2000).

O azoto no solo

Numa pastagem, o pastoreio direto pode também reduzir a taxa de fixação do N_2 em virtude de um temporário “excesso” de N no solo. Estima-se que 60 - 80% do N consumido pelos animais através da ingestão da biomassa aérea na pastagem pode ser devolvido ao solo através da urina e fezes, limitando a fixação simbiótica uma vez que aumenta o teor de N disponível no solo para as plantas presentes (Carranca, 2013).

O fósforo no solo e na planta

O fósforo, além de ser o nutriente mais importante para as leguminosas, é um recurso natural não renovável (Aquilar & Diest, 1981). Em geral, os fertilizantes minerais fosfatados são aplicados ao solo numa forma solúvel, facilmente disponível para as plantas. Por vezes o P total nos solos é elevado, mas sendo um elemento quimicamente instável no solo quando na forma solúvel em água, pode reagir com o Fe e o alumínio (Al) do solo, precipitando, formar compostos pouco solúveis (processo de sorção) com a argila, ou complexar com a matéria orgânica do solo (Horta & Torrent, 2010). Este elemento mineral pode também perder-se no solo por erosão, escorrência superficial ou lixiviação (Horta & Torrent, 2007). Daqui se conclui que pode

ser necessária a adição de uma pequena quantidade de P ao solo, aplicado como fertilizante *starter*, logo no início do estabelecimento das pastagens (Aquilar & Diest, 1981).

Por outro lado, as plantas podem adotar mecanismos de adaptação ao local. Dentre estes mecanismos destacam-se as simbioses com os fungos micorrízicos. Estes fungos do solo podem penetrar as células corticais das raízes formando as endomicorrizas (Berbara et al., 2006; Boucho et al., 2016). Estes fungos micorrízicos podem associar-se (simbiose) a grande parte das plantas herbáceas, em particular as espécies pratenses. As hifas emitidas pelos fungos vão “substituir” os pêlos absorventes e aumentar o volume de solo explorado pelas raízes, uma vez que podem atingir grandes dimensões e penetrar os microagregados do solo, onde as raízes não conseguem chegar (Anzanello et al., 2011). Deste modo, as hifas possibilitam a absorção de água e nutrientes permitindo um melhor desenvolvimento da planta. Por outro lado, o micélio micorrízico exsuda para o solo ácidos orgânicos que podem solubilizar o P do solo tornando-o disponível para a planta em especial nos solos calcários (Berbara et al., 2006). À semelhança da simbiose rizobiana, a simbiose micorrízica exige que a planta hospedeira disponibilize produtos fotoassimilados para o fungo associado obter a energia de que necessita, uma vez que este processo é também muito energético (Berbara et al., 2006).

Atendendo a que a fixação simbiótica do N pelas leguminosas e a absorção do N do solo pelas gramíneas ou outras plantas não leguminosas associadas dependem de uma nutrição fosfatada adequada, a micorrização ganha particular importância nas pastagens (Souza et al., 1994). Parte do P inorgânico no solo (fosfato) absorvido pelas hifas do fungo é transformada em polifosfatos (moléculas orgânicas sintetizadas pelo fungo micorrízico) que são transportados para os arbúsculos (no interior das células corticais) e aí, por difusão, são disponibilizados para a planta. No entanto, podem também ser armazenados nas vesículas para serem utilizados quando necessário. De referir ainda que os efeitos positivos das micorrizas (arbusculares) para as plantas associadas são mais acentuados em condições de *stress*, por exemplo, em condições de deficiência de P e água no solo (De Varennes, 2003; Berbara et al., 2006).

Ambos os processos de simbiose, rizobiana e micorrízica, podem ocorrer simultaneamente na mesma planta leguminosa, dando-se um mutualismo tripartido que deverá promover um maior desenvolvimento das plantas, favorecendo ambos os microrganismos envolvidos nas simbioses (De Varennes & Goss, 2007). Segundo estes autores (2007), este estímulo deriva do fornecimento acrescido de P aos nódulos (resultante da associação micorrízica), mas é também consequência de

alterações no processo de sinalização entre a planta e os microrganismos. Por outro lado, uma vez que a simbiose micorrízica favorece o desenvolvimento vegetativo e permite uma maior taxa fotossintética (plantas melhor nutridas) vai, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade de produtos fotoassimilados a fornecer a ambos os microrganismos simbiontes (Berbara et al., 2006; De Varennes & Goss, 2007; Carranca, 2013).

Do referido anteriormente se conclui que uma deficiência em P no solo pode causar severas limitações nas interações simbióticas e conseqüente redução do N₂ fixado e da produção de biomassa aérea (De Varennes, 2003; Carranca, 2013; Weisany et al., 2013). Uma deficiência moderada de P no solo pode não produzir sintomas evidentes de deficiência nas plantas, mas em deficiência severa as plantas podem adquirir uma coloração que varia entre a verde-escura e a púrpura (Grant et al., 2001; Menguel & Kirkby, 2001; Sfredo & Borkert, 2004). Os sintomas de deficiência surgem primeiro nas folhas mais velhas porque o P é facilmente mobilizado na planta, dos tecidos mais velhos para os mais novos, quando o fornecimento do nutriente é limitante (De Varennes, 2003). Outros sintomas de deficiência de P incluem a diminuição da altura das plantas, o atraso na emergência das folhas e redução do desenvolvimento vegetativo e das raízes, diminuição da produção de sementes, e uma baixa razão parte aérea/raiz (Grant et al., 2001; De Varennes, 2003). Em virtude da baixa disponibilidade de P na maioria dos solos portugueses deve apostar-se no uso de espécies/variedades pratenses tolerantes a baixos níveis de P disponível no solo, visando uma maior eficiência do uso do nutriente pela planta (Haque et al., 1985).

Por outro lado, é de rezear a toxicidade de P quando a concentração nas plantas for superior a 10 - 20 g P kg⁻¹ MS (De Varennes, 2003). Um elevado nível de P disponível no solo inibe a eficiência micorrízica e faz com que as plantas apresentem um fraco desenvolvimento radicular, com raízes claras e as folhas mais velhas com clorose nos bordos (Moreira, 2002).

Segundo De Varennes (2003), uma concentração adequada de P na parte aérea das plantas é de 2 - 5 g P kg⁻¹ MS. O valor mínimo de concentração é confirmado por De Epstein & Bloom (2006) que referiram a concentração de 2 g P kg⁻¹ MS como um valor mínimo adequado para o crescimento das plantas em geral.

2.3. Avaliação da fixação simbiótica do N₂

O azoto atmosférico é formado maioritariamente por ¹⁴N (96,337%), mas contém também 0,3663% de átomos de ¹⁵N. Este número é designado por abundância

natural do ^{15}N na atmosfera, ou enriquecimento natural em ^{15}N na atmosfera (Carranca, 2000). O isótopo ^{15}N tem sido largamente usado em estudos para avaliação rigorosa e integrada da fixação simbiótica do N_2 pelas leguminosas. Quando se usa a técnica de diluição isotópica do ^{15}N para a avaliação simbiótica do N_2 assume-se que o sistema fixador do N_2 não discrimina entre o ^{14}N e o ^{15}N absorvido do solo e os fixados da atmosfera (Carranca, 2000).

Dentre os métodos com utilização do marcador ^{15}N , o método da diluição isotópica do ^{15}N envolve a adição ao solo de pequenas quantidades de adubo azotado enriquecido com átomos de ^{15}N e é largamente utilizado para avaliação integrada da fixação simbiótica do N_2 . Este método permite discriminar entre o N da atmosfera e o N absorvido do solo ou de outras fontes azotadas. É um método que permite, por exemplo, identificar os genótipos de leguminosas com maiores níveis de N_2 fixado e a distribuição deste nutriente nos diferentes órgãos da planta (Carranca, 2000).

Para a técnica da diluição isotópica é necessário recorrer a uma planta de referência, não-fixadora do N_2 , para estimar, indiretamente, o teor de N absorvido do solo pela planta fixadora. Assim, neste estudo optou-se pela utilização do azevém anual, como planta de referência. Assume-se que tanto as plantas leguminosas em estudo como o azevém anual absorvem o ^{15}N adicionado ao solo e o ^{15}N residual do solo na mesma proporção, independentemente das quantidades disponíveis (Carranca, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do ensaio

O ensaio foi realizado com controlo da temperatura e humidade relativa do ar e radiação solar, em estufa do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, localizada em Oeiras.

Os dados relativos à temperatura (°C) máxima, mínima e média do ar e do solo, bem como a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) no interior da estufa estão representados nas Fig. 2, 3 e 4, respetivamente. Todos os dados foram recolhidos diariamente, considerando o período diurno das 07 h 00 min às 19 h 00 min e o noturno das 20 h 00 min às 06 h 00 min. Os dados da temperatura do solo e radiação PAR foram obtidos através de sensores DELTA-T LOGGER. Estes dispositivos permitiram o registo horário da temperatura do solo e da radiação PAR na estufa. Para a medição da temperatura e humidade do ar, utilizou-se um sensor combinado H7508A-PT1000, que mediu, simultaneamente, a temperatura e a humidade do ar. Este dispositivo estava integrado num sistema informático instalado na estufa pela empresa *Honeywell*, que permitiu o armazenamento dos dados num computador. Desta forma foi possível fazer uma monitorização diária das condições ambientais na estufa.

As temperaturas médias do ar registadas durante o período experimental no interior do compartimento da estufa (Fig. 2) foram as seguintes: $T_{\min} = 17,1 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,4$; $T_{\max} = 21,9 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5$ e $T_{\text{méd}} = 19,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,3$.

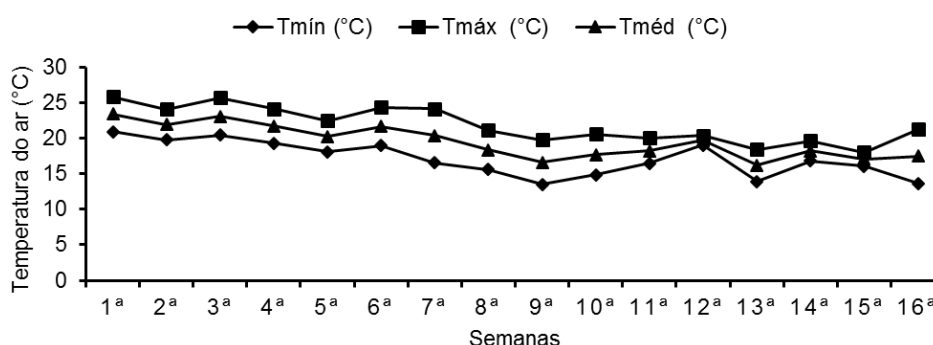


Fig. 2. Evolução da temperatura (°C) do ar na estufa do INIAV (Oeiras), durante o período experimental (16 semanas).

O sensor para medição da temperatura do solo foi instalado na 2ª semana do período experimental, a uma profundidade aproximada de 5 cm. As temperaturas mínimas, médias e máximas registadas no solo durante o período experimental (Fig. 3) foram as seguintes: $T_{\min} = 11,6 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,5$; $T_{\max} = 23,1 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ e $T_{\text{méd}} = 17,3 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,7$, verificando-se uma ligeira diferença em relação às temperaturas do ar.

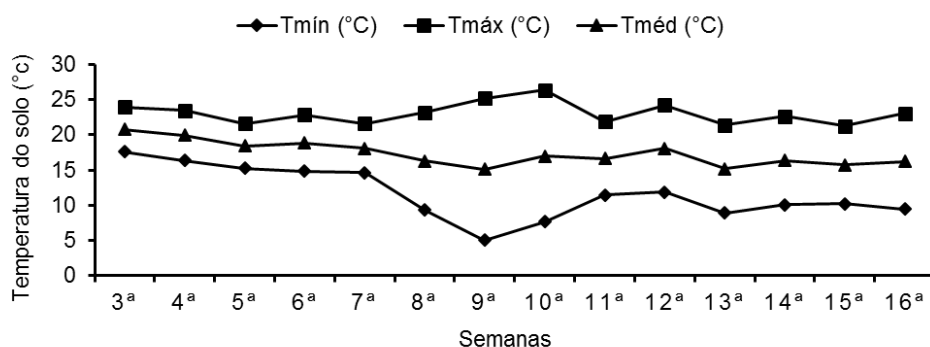


Fig. 3. Evolução da temperatura (°C) no solo, durante o período experimental (da 2ª à 16ª semana).

A temperatura mínima do solo apresentou algumas variações ao longo do período experimental, atingindo valores abaixo dos 8 °C nas 8ª e 9ª semanas (Fig. 3). Por este motivo foi necessário aquecer o compartimento para que a atividade rizobiana não fosse comprometida, uma vez que abaixo dos 10 °C o rizóbio reduz a sua atividade (Carranca et al., 2009). Fagan et al. (2007) observaram também que a temperatura de 25 °C é a ideal para a atividade rizobiana, enquanto temperaturas inferiores a 10 °C reduzem a atividade ou inibem completamente a atividade por várias bactérias fixadoras do N₂. O efeito do aquecimento do compartimento da estufa foi notório, registando-se um aumento da temperatura do solo nas semanas seguintes para valores mínimos da ordem dos 10 °C e uma consequente recuperação do desenvolvimento das plantas leguminosas.

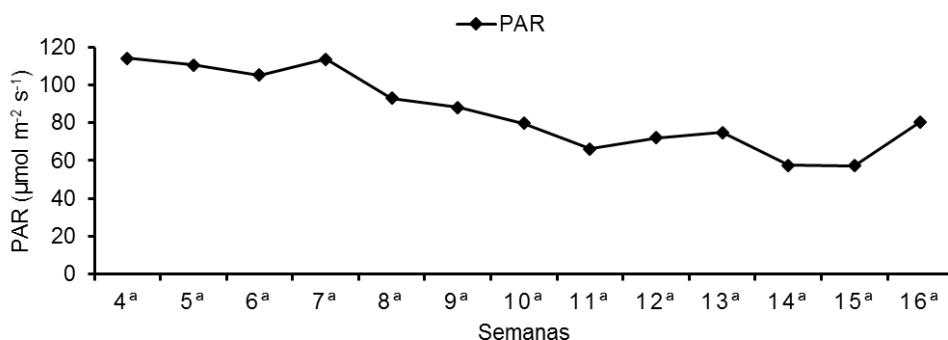


Fig. 4. Evolução da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) na estufa do INIAV (Oeiras), ao longo do período experimental (da 4ª à 16ª semana).

A radiação PAR média registada durante o período experimental foi de aproximadamente $85,6 \pm 19,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A radiação fotossinteticamente ativa diminuiu a partir da 8ª semana (Fig. 4), registando-se os valores mais baixos no mês de Novembro de 2015.

A humidade relativa média do ar no compartimento durante a noite foi de $\text{HR} = 80,3\% \pm 2,9$ e durante o dia $\text{HR} = 68,8\% \pm 5,3$.

3.2. O solo

O solo utilizado no ensaio foi recolhido na Herdade da Mitra, em Évora. Correspondeu ao horizonte Ah de um Regossolo epiléptico (WRB, 2006) desenvolvido sobre rocha gnáissica, considerando-se representativo para o cultivo de pastagens. O solo utilizado apresentava textura areno - franca a arenosa (diagrama triangular de Gomes & Silva, 1962) e continha muito baixo teor de P extraível ($2,57 \text{ mg kg}^{-1}$) e um teor baixo de C_{org} ($7,97 \text{ g kg}^{-1}$), sendo ligeiramente ácido ($\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} = 5,8$). As principais características físico-químicas do solo encontram-se registadas no Quadro 1.

Quadro 1. Valores da composição granulométrica, do complexo de troca e do fósforo (P) e potássio (K) extraíveis nas amostras do solo (0 – 20 cm) da Herdade da Mitra utilizado no ensaio

Amostra	Granulometria				pH					Bases de troca					Mn^{2+}	SB	Extraíveis	
	AG	AF	L	AR	H_2O	KCl	C_{org}	N	C/N	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	Al^{3+}			P	K
	g kg ⁻¹						g kg ⁻¹			cmol _c kg ⁻¹							mg kg ⁻¹	
Média	484	414	51	51	5,75	4,31	7,97	0,6	13,28	0,84	0,19	0,05	0,10	0,35	0,01	1,19	2,57	30,88
Desvio padrão	7,7	6,6	0,5	2,1	0,11	0,01	0,53	0,03	1,39	0,04	0,01	0,01	0,01	0,03	0,00	0,04	0,36	2,46

AG = areia grossa; AF = areia fina; L = limo; AR = argila; C_{org} = carbono orgânico; N = azoto; Ca^{2+} = ião cálcio; Mg^{2+} = ião magnésio; Na^+ = ião sódio; SB = soma das bases de troca; Mn^{2+} = ião manganês; Al^{3+} = ião alumínio de troca.

3.3. Delineamento experimental

Para a instalação do ensaio usaram-se 64 vasos com capacidade individual para 3 kg de solo, crivado a 5 mm. O delineamento do ensaio foi em blocos completamente casualizados e quatro repetições, com um tratamento fatorial de quatro níveis de P e três espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa), cultivadas como culturas estremes e em consociação (Fig. 5). Resumindo, para cada espécie pratense e consociação foram utilizados dezasseis vasos, respeitantes aos quatro níveis de P e às quatro repetições.

O trabalho experimental teve a duração de 16 semanas (103 dias), com sementeira realizada em 4 de Outubro de 2015 e a colheita das plantas em 14 de Janeiro de 2016, ao início da floração da serradela rosa.

Instalação do ensaio

A seleção das cultivares e estirpes rizobianas a usar no ensaio foi da responsabilidade da empresa *Fertiprado*, a principal empresa do setor de sementes para pastagens em Portugal, e uma das maiores no mundo. As densidades de sementeira utilizadas para o azevém anual (*Lolium multiflorum* L. cv. Liflória), trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L. cv. Dalkeith) e serradela rosa (*Ornithopus sativus* Brot. cv. Margurita) foram de 30 kg sementes ha⁻¹ (Lopes et al., 2006), 15 kg sementes ha⁻¹ (Gonçalves, 2015) e 20 kg sementes ha⁻¹ (Perdigão, 2011), respetivamente. No caso da consociação, estimou-se a média entre os três valores considerados para as culturas em estreme, equivalente a uma densidade de sementeira de 20 kg sementes ha⁻¹. A avaliação das densidades de sementeira a usar no ensaio foi motivo de uma exaustiva pesquisa bibliográfica, e de consulta de especialistas, pois a mesma não está padronizada e depende de muitos fatores (sistema cultural, mistura, vasos). As densidades de sementeira por vaso foram determinadas através da expressão:

$$[X \text{ (sementes por ha)} * 3 \text{ kg (solo por vaso)}] / [10000 \text{ m}^2 \text{ (1 ha)} * 0,15 \text{ m (altura média dos vasos)} * 1,3 \text{ (densidade do solo)} * 1000], \quad (\text{eq. 2})$$

donde resultam, 0,05 g semente vaso⁻¹ para o azevém anual; 0,03 g semente vaso⁻¹ para o trevo subterrâneo e 0,04 g sementes vaso⁻¹ para a serradela rosa e consociação.

Para o inóculo da serradela rosa usaram-se várias estirpes de *Bradyrhizobium* spp., e para o trevo foi usado o *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. As sementes foram fornecidas já com o inóculo.

Em adubação de fundo distribuiu-se, uniformemente em todos os vasos, o K, na forma de sulfato de K a 50% e na dose de 60 kg K ha⁻¹, equivalente a 97 mg K vaso⁻¹. O fósforo foi também distribuído no solo em adubação de fundo, na forma de superfosfato a 18%, com carbonato de cálcio. Os níveis de P usados foram os seguintes: P0 (0 kg P ha⁻¹), P1 (30 kg P ha⁻¹ ≈ 48 mg P vaso⁻¹), P2 (60 kg P ha⁻¹ ≈ 96 mg P vaso⁻¹) e P3 (90 kg P ha⁻¹ ≈ 144 mg P vaso⁻¹). A dose média de P (60 kg ha⁻¹) é a normalmente recomendada para pastagens em solos ácidos, pobres em P (LQARS, 2000).

Durante o período experimental as plantas foram regadas com água desmineralizada, a 70% da capacidade de campo do solo, previamente determinada em laboratório. A remoção de infestantes foi efetuada manualmente, sempre que necessária.

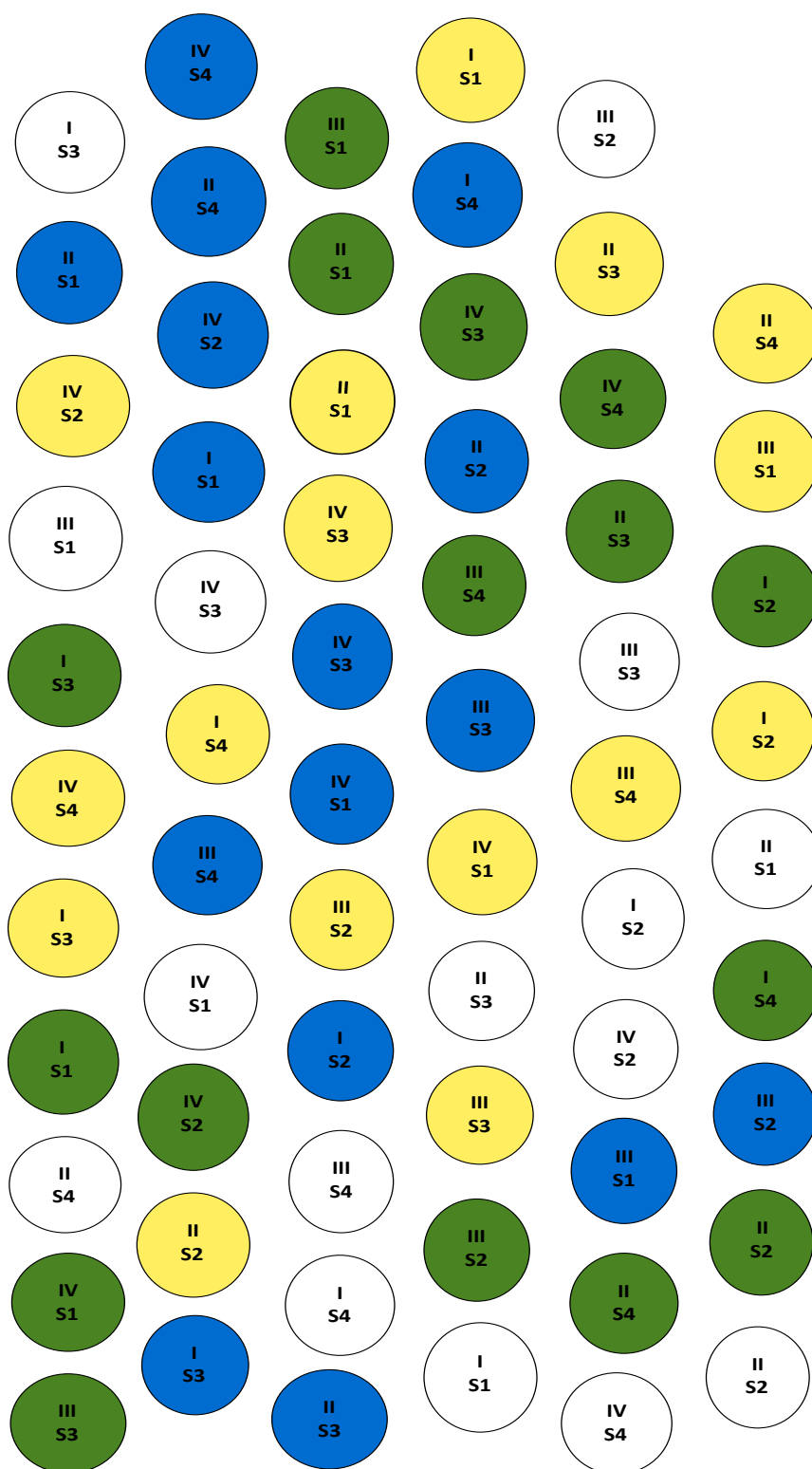


Figura 5. Representação esquemática da disposição dos vasos na bancada por espécies (S1 = *Lolium multiflorum* L.; S2 = *Trifolium subterraneum* L.; S3 = *Ornithopus sativus* Brot.), S4 = Consociação), repetições (I – IV) e teores de P (P0 = branco; P1 = amarelo; P2 = verde; P3 = azul).

Aplicação do adubo azotado enriquecido com ^{15}N

Para a avaliação da capacidade de fixação simbiótica das leguminosas recorreu-se ao método da diluição isotópica do ^{15}N (Carranca et al., 1999; Carranca, 2000). Para o efeito aplicou-se (em 12 de Outubro) o fertilizante mineral na forma de nitrato de amónio duplamente enriquecido com 5% de átomos de ^{15}N ($^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 5%). O adubo mineral foi diluído em água destilada e aplicado ao solo com um pulverizador (para melhor distribuição no solo), uma semana após a germinação das sementes e na dose de 4 kg N ha^{-1} . Esta dose de N foi a mínima adequada para servir de marcador e para que a cultura testemunha, o azevém anual, pudesse sobreviver durante o período experimental.

3.4. Medições e amostragens

Medição indireta do teor em clorofila

Em duas fases do ciclo vegetativo (07/12/2015: fase vegetativa e 13/01/2016: início da floração da serradela rosa) avaliou-se, indiretamente, o teor de clorofila em cada modalidade de P. Para o efeito, usou-se um medidor de clorofila portátil SPAD-502 (KONICA-Minolta, Japão) que mede a intensidade da cor verde das folhas, como indicador do teor de clorofila.

O funcionamento do SPAD-502 baseia-se na medição da quantidade de luz transmitida através de uma folha sujeita, sequencialmente, à radiação em dois comprimentos de onda (650 e 940 nm) e que depois é convertida em sinais elétricos analógicos e posteriormente digitais. Estes sinais são convertidos em leituras SPAD, através de um microprocessador, constituindo um índice da intensidade da cor verde da folha (Neto, 2007).

A atividade fotossintética da planta, o teor de proteínas solúveis, a concentração de N total e o teor de alguns micronutrientes (ex: Fe) existentes nas folhas são variáveis que podem ser correlacionadas com o teor de clorofila no tecido foliar (Ramos et al., 2010). O medidor de clorofila Minolta SPAD-502 tem sido muito usado como método expedito de diagnóstico do estado nutritivo de diversas culturas, em especial o azotado, permitindo uma avaliação não-destrutiva do tecido foliar (Zotarelli et al., 2003, Neto, 2007; Figueiredo et al., 2008; Madeira et al., 2009). Todavia, os estudos com medições SPAD em leguminosas pratenses são raros. Guo et al. (2016), realizaram medições SPAD na serradela rosa e no trevo subterrâneo,

contudo apenas obtiveram regressões significativas para a relação entre as leituras SPAD e o peso seco (g PS planta^{-1}) e teor de N total na biomassa radicular.

No presente estudo, as leituras SPAD registadas corresponderam à média de 10 leituras efetuadas em diferentes folhas e posições no vaso (Fig. 6). As medições foram efetuadas para cada espécie vegetal e modalidade, inclusive nas espécies consociadas.



Fig. 6. Leituras SPAD com o medidor de clorofila Minolta SPAD-502.

Colheita das plantas

A colheita das plantas, completas, foi efetuada em 14 de Janeiro de 2016, 103 dias após a sementeira (DAS) e após a entrada em floração da serradela rosa (Fig. 7). Colheram-se todas as plantas completas de cada vaso (parte aérea + raiz + nódulos, no caso das leguminosas) para avaliação da produtividade e análise química. Foi efetuada a contagem do número de plantas/vaso (Anexo 2), tendo-se registado valores médios/vaso de onze plantas de azevém anual, oito plantas de serradela rosa e três plantas de trevo subterrâneo em monocultura, e seis plantas de azevém anual, quatro de serradela rosa e uma de trevo subterrâneo em consociação. Separou-se a parte aérea das raízes e dos nódulos. As raízes e nódulos no solo foram recuperados e juntos ao correspondente material anteriormente separado.

Todo o material vegetal foi lavado com água destilada, pesado para determinação do peso verde (g PV planta^{-1}) e colocado a secar em estufa com ventilação forçada, durante um período de 48 horas e temperatura aproximada de 65 °C. Depois da secagem pesou-se para determinação do peso seco (g (ou mg) PS planta^{-1}) e moeu-se a 0,5 mm para análise química.



Fig. 7. Início da floração da serradela rosa (*Ornithopus sativus* Brot.).

Amostragem do solo

Depois da colheita do material vegetal, o solo foi seco à temperatura ambiente e posteriormente crivado a 2 mm, separando deste modo a fração grosseira (> 2 mm) da fração fina (< 2 mm) e permitindo uma maior homogeneidade das amostras para análise química. Todas as determinações foram realizadas na fração fina do solo.

3.5. Métodos analíticos

Plantas

Determinação da concentração de P

O teor de P_{total} (g P kg^{-1} PS) no material vegetal (órgãos da planta) foi determinado por mineralização por via seca, recorrendo a espectrometria de emissão de plasma com detetor ótico (Long, 1974; Duarte et al., 1979).

Determinação da concentração de N e enriquecimento em ^{15}N

O método da diluição isotópica do ^{15}N para a quantificação do N_2 fixado na simbiose com as leguminosas é baseado no enriquecimento da planta com átomos de

^{15}N , descontando a abundância natural do ^{15}N da atmosfera (0,3663%) e o resultante da absorção do solo (medido pelo teor de ^{15}N na planta de referência, o azevém anual). Os teores de N total (g N kg^{-1} PS) e ^{15}N (%) foram determinados por combustão direta e espectrometria de massa, respetivamente, no Laboratório de Isótopos Estáveis da Universidade Autónoma de Madrid (Espanha).

Solo

A metodologia usada para determinar o teor de C orgânico ($\text{g C}_{\text{org}} \text{kg}^{-1}$) no solo, baseia-se no método de combustão seca. O carbono orgânico foi calculado através da diferença entre a quantidade de C_{total} e o teor de carbonatos totais, calculados através do método volumétrico. Como o solo apresentava reação ácida, a presença de carbonatos era muito reduzida, por isso considerou-se o teor de C_{org} igual ao de C_{total} .

As bases de troca Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e Na^{+} adsorvidas no complexo de troca do solo foram extraídas com uma solução de acetato de amónio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1M, a pH 7,0 e expressas em $\text{cmol}_{(+)} \text{kg}^{-1}$ (Metson, 1961). O Ca^{2+} e o Mg^{2+} foram doseados por espectrofotometria de absorção atómica com chama, e o K^{+} e Na^{+} foram medidos por fotometria de chama.

Os teores de P e K extraíveis do solo (mg kg^{-1}) foram determinados pelo método de Egnér-Riehm (Riehm, 1958; Balbino, 1968).

3.6. Cálculos e análise estatística dos resultados

O teor de N derivado da atmosfera pela leguminosa (%Nda) foi determinado de acordo com a seguinte expressão (Carranca et al., 1999):

$$\text{Nda (\%)} = \{1 - [\text{excesso de átomos } ^{15}\text{N}_{(\text{sf})} (\%) / \text{excesso átomos } ^{15}\text{N}_{(\text{snf})} (\%)]\} \times 100 \text{ (eq.3)}$$

onde,

Nda (%) = teor de N_2 derivado da atmosfera (%),

excesso de átomos de ^{15}N (%) = diferença entre o enriquecimento em ^{15}N nas plantas fixadoras e não fixadoras e a abundância natural da atmosfera (0,3663%),

sf e snf = sistemas fixador e não fixador, respetivamente.

Para avaliar o excesso de átomos de ^{15}N nos nódulos do trevo subterrâneo e da serradela rosa seria necessário produzir leguminosas com nódulos não ativos (ou seja, não fixadores do N_2) para determinação da abundância natural do ^{15}N nos nódulos não ativos, cujo valor seria deduzido do enriquecimento em ^{15}N nos nódulos fixadores. Uma vez que este valor não foi determinado, assumiu-se a abundância natural do ^{15}N na atmosfera para deduzir nos nódulos ativos para consequente determinação do excesso de átomos de ^{15}N no nódulo e posterior determinação da %Nda.

A quantidade de N_2 fixado foi calculada de acordo com a seguinte expressão (Carranca et al., 1999):

$$\text{N}_2 \text{ fixado (mg N planta}^{-1} \text{ PS)} = [\% \text{Nda} \times \text{N total na planta fixadora (mg N planta}^{-1} \text{ (PS))}] / 100$$

(eq. 4)

Os resultados foram analisados estatisticamente com o programa *Statistica 6.0*, recorrendo-se à Análise de Variância (ANOVA), usando o Modelo Linear Generalizado (MLG) para as leituras SPAD, a biomassa aérea e radicular, o peso e número de nódulos, os teores de N total, P total, Nda, N_2 fixado e para a relação N/P na biomassa aérea e radicular. A ANOVA *Main-effects* foi usada para os teores de N e P totais e enriquecimento em ^{15}N nos nódulos porque as repetições foram juntas para obtenção de material vegetal suficiente para análise química. Os resultados foram apresentados como médias, e as médias foram comparadas usando o teste robusto de Bonferroni ($p < 0,05$) sempre que o valor de F na ANOVA foi significativo.

Ajustaram-se regressões logarítmicas e linear às leituras SPAD determinadas na 2ª data e os teores de N total e N_2 fixado na biomassa aérea, respectivamente. Para a relação entre o peso seco da biomassa aérea e a concentração de P total nessa biomassa, ajustou-se uma curva polinomial. Ajustaram-se também curvas polinomiais para os resultados da biomassa aérea do azevém anual e das três espécies em consociação em resposta ao tratamento fosfatado. Em virtude de as curvas apresentarem valores de R^2 muito baixos, são apresentadas no Anexo 3. Determinaram-se as curvas polinomiais da produção das espécies pratenses (trevo subterrâneo, serradela rosa e azevém anual), em monocultura e consociadas, em resposta ao tratamento fosfatado (as curvas não significativas são apresentadas no Anexo 3).

Por último ajustaram-se os valores do P extraível no solo e o tratamento fosfatado numa regressão polinomial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Leituras SPAD

As leituras SPAD medem a intensidade da cor verde das folhas, um indicador do teor de clorofila (Neves et al., 2005). Assim, quanto maior o valor de leitura SPAD, maior a intensidade da cor verde e, provavelmente, maior o teor de clorofila. No entanto, de acordo com Pestana et al. (2001), em caso de deficiência de Fe tal pode não se verificar. A determinação da concentração de clorofila por meio de medidores portáteis como o SPAD tem sido usada para predizer também o nível nutricional em N das plantas (Barbosa et al., 2012).

Da observação do Quadro 2 verifica-se que as leituras SPAD diferiram significativamente ($p < 0,001$) com as datas da medição, os sistemas culturais, as espécies pratenses e o tratamento fosfatado. As maiores leituras foram medidas na 1ª data (63 dias após a sementeira, DAS), durante a fase vegetativa), decrescendo durante o ciclo cultural.

No caso da monocultura, os valores foram significativamente superiores aos da consociação, provavelmente por não existir o ensombramento causado pelo diferente porte das espécies e alguma competição pelo N do solo. Considerando o efeito médio dos outros fatores, no que diz respeito às espécies pratenses o azevém anual foi a que obteve uma leitura menor (18), ainda que não se possa considerar significativamente diferente da obtida para a serradela (24). O tratamento P2 (60 kg P ha⁻¹) permitiu as maiores leituras SPAD, apesar de não diferir significativamente do tratamento P1 (30 kg P ha⁻¹). É interessante verificar que as leituras obtidas, quando não se aplicou P ao solo e quando se aplicou o nível máximo (90 kg P ha⁻¹), não diferiram significativamente.

Da análise da interação das leituras SPAD para ambos os sistemas culturais, as espécies pratenses e o tratamento fosfatado verificou-se que os valores SPAD na gramínea não variaram ($p \geq 0,05$) com o tratamento (Fig. 8) possivelmente porque o azevém ficou sujeito a alguma carência azotada, visto que se aplicaram apenas 0,036 g de adubo azotado por vaso (4 kg N ha⁻¹).

Verifica-se também que, em monocultura, o trevo subterrâneo apresentou leituras significativamente superiores (cerca do dobro) às da serradela rosa, para todos os níveis de P (Fig. 8). No entanto, neste sistema cultural o tratamento fosfatado não afetou significativamente as leituras SPAD em ambas as leguminosas. Na

consociação, as leituras SPAD no trevo subterrâneo foram significativamente superiores na dose P2, atingindo o valor 36, não se tendo verificado diferenças significativas entre os tratamentos P1, P2 e P3 para a serradela rosa.

Quadro 2. Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) das leituras SPAD determinadas nas três espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) em duas datas do ciclo vegetativo (07/12/2015 e 13/01/2016), em ambos os sistemas culturais e em resposta ao tratamento fosfatado (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹)

Fonte de Variação	Leituras SPAD
Data da medição:	
07/12/2015	28a
13/01/2016	20b
Sistema cultural:	
Monocultura	27a
Consociação	21b
Espécie vegetal:	
Azevém anual	18b
Trevo subterrâneo	29a
Serradela rosa	24ab
Tratamento fosfatado:	
P0	20c
P1	25ab
P2	28a
P3	25bc
ANOVA	Valores de F
Data da medição (D)	68 ***
Sistema cultural (S)	35 ***
Espécie vegetal (V)	41 ***
Tratamento (P)	13 ***
Interações:	
D x S	9 **
S x V	100 ***
S x P	7***
V x P	7 ***
S x V x P	4 **
Restantes interações	ns

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente para $p < 0,05$, de acordo com o teste de Bonferroni; ns, **,***= Valores de F não significativos ($p \geq 0,05$), ou significativos para $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente.

Genericamente, o tratamento P2 (60 kg P ha⁻¹) permitiu leituras SPAD mais elevadas, isto é, maiores teores de clorofila e, conseqüentemente, prováveis maiores taxas fotossintéticas em ambas as leguminosas cultivadas em ambos os sistemas culturais, muito em especial no caso do trevo subterrâneo. Hart (1988) verificou também que plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.) bem nutridas em P

apresentavam boa capacidade fotossintética. No entanto, Pérez et al. (2016) observaram que a taxa fotossintética em plantas de giesta (*Cytisus* spp.) não era influenciada pela quantidade de P aplicado. Este facto deveu-se, provavelmente, aos suficientes teores de P disponível no solo para esta planta leguminosa nativa, bem adaptada ao local.

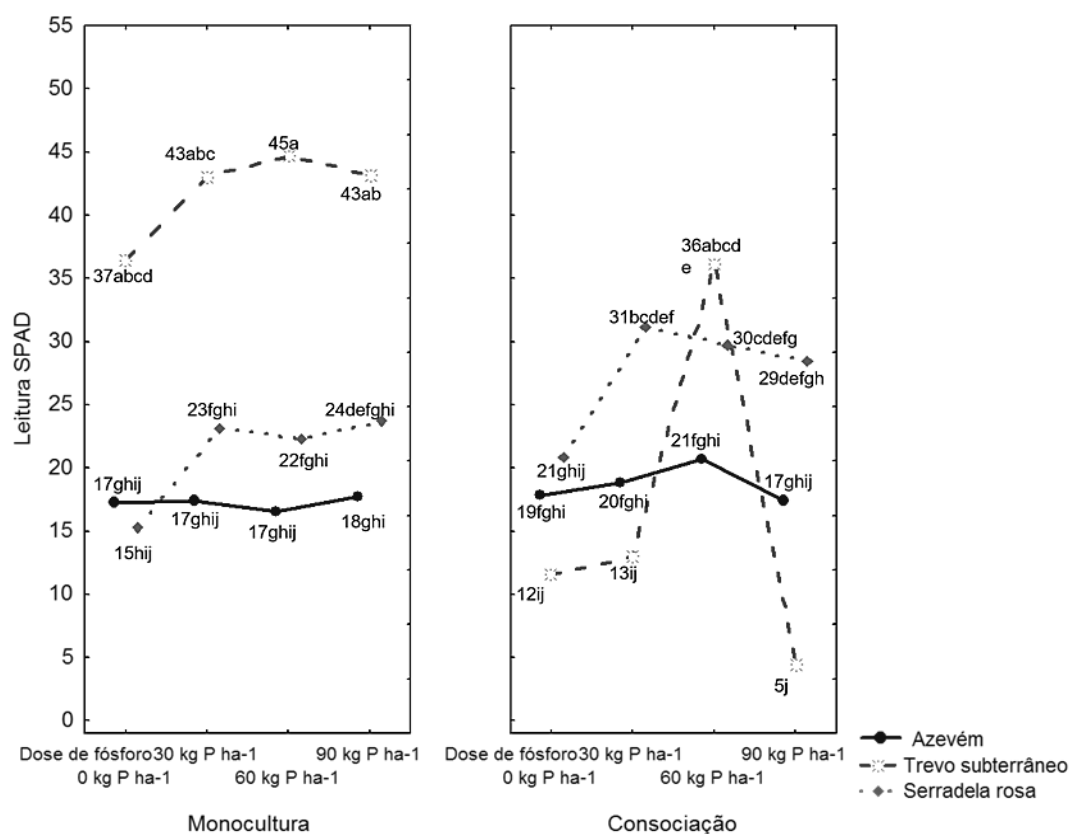


Fig. 8. Resultado da interação entre as leituras SPAD obtidas para as espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa), os sistemas culturais (cultura estreme e consociação) e o tratamento fosfatado, para o efeito médio das datas de amostragem; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni.

Para uma eficiente fixação simbiótica de N_2 é exigida uma boa taxa fotossintética, por isso, espera-se que plantas com leituras SPAD mais elevadas apresentem uma maior taxa de fixação simbiótica (Hart, 1988). Esta afirmação é sustentada pelos resultados deste estudo, uma vez que o trevo subterrâneo foi a espécie pratense com as leituras SPAD mais elevadas e com a maior quantidade de N_2 fixado, principalmente ao nível dos tratamentos P2 e P3, quando comparado com a serradela rosa (Quadro 6, Fig. 17). Este facto é explicado pela maior produção de biomassa aérea no caso do trevo. No entanto, a serradela rosa, inoculada com *Bradyrhizobium* spp., de crescimento mais lento que o *Rhizobium* usado na inoculação

do trevo subterrâneo, apresentou maior taxa de eficiência simbiótica, expressa pelo maior valor de %Nda (Quadro 6).

Por observação da curva de regressão logarítmica (Fig. 9) resultante de um melhor ajustamento dos resultados obtidos no presente estudo verifica-se que às maiores leituras SPAD corresponderam as maiores concentrações de N total na biomassa aérea das leguminosas (valores da biomassa apresentados no Quadro 3), em especial no caso do trevo subterrâneo, situando-se os teores de N total entre 25 e 35 g N kg⁻¹ PS. Este facto parece confirmar que a uma maior taxa fotossintética correspondem maiores teores de N₂ fixado nas leguminosas. Em ambos os modos de produção, o azevém foi a espécie vegetal com as menores leituras SPAD, a que corresponderam as menores concentrações de N total, em consequência de um baixo teor de N disponível no solo, insuficiente para um adequado desenvolvimento vegetativo. No entanto, os valores mais elevados de N total e leituras SPAD no azevém foram registados em consociação, indicando que algum N absorvido pela gramínea terá resultado da transferência das leguminosas consociadas.

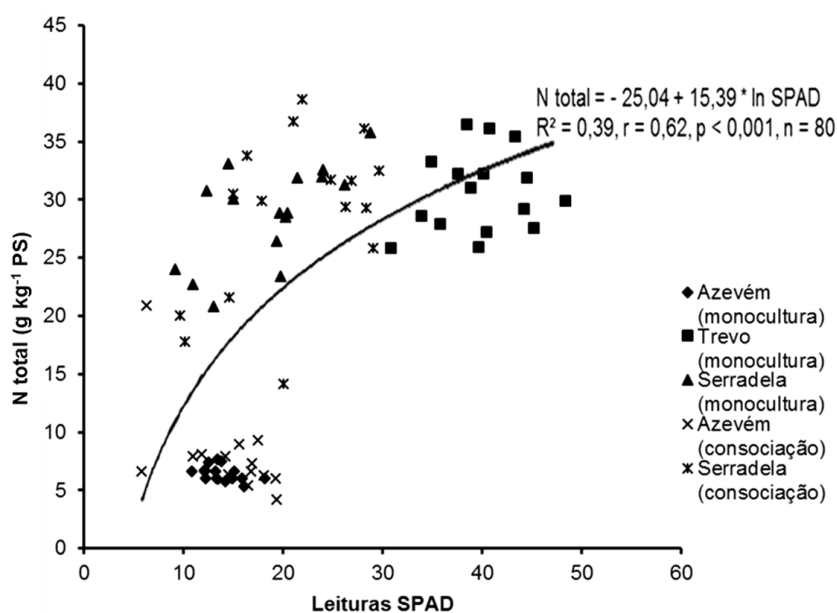


Fig. 9. Regressão logarítmica entre as leituras SPAD e a concentração de N total na biomassa aérea (g N kg⁻¹ PS) para cada espécie pratense e sistema cultural ($R^2 = 0,39$; $r = 0,62$; $p < 0,001$; $n = 80$).

Esta curva logarítmica de ajustamento das leituras SPAD e teores de N total nas folhas das espécies pratenses (Fig. 9) apenas justifica 39% da variância dos resultados, sendo todavia uma curva semelhante às determinadas por Neto (2007) para folhas de pereiras “Rocha” jovens (Teor clorofila total = $65,01 e^{0,06x}$, x = leitura

SPAD, $R^2 = 0,97$, $p = 0,001$) e Figueiredo (2011) para folhas de plantas de arroz produzido por alagamento (Teor clorofila total = $30,922 x^{0,1659}$, x = leitura SPAD, $R^2 = 0,95$, $p = 0,001$). O fraco ajustamento observado no presente estudo pode dever-se ao uso de diferentes tipos de espécies pratenses, aos diversos tipos de folhas, à diferente intensidade de cor e também ao facto de se ter determinado a concentração de N em toda a biomassa aérea e não apenas nas folhas.

4.2. Biomassa das plantas

A avaliação da produção de biomassa aérea permite prever a potencial produtividade das espécies pratenses no campo, bem como a possível densidade do coberto vegetal no solo. Segundo Moreira (2002) e Bonfim-Silva et al. (2011), a produção de biomassa depende, designadamente, da capacidade de interceção da radiação solar pela cultura, da actividade fotossintética e do destino dos produtos assimilados (usados quer para o crescimento da planta, como reserva, ou para a respiração de manutenção ou dos organismos simbiontes associados).

No Quadro 3 apresentam-se os valores da biomassa aérea e radicular produzida pelas espécies pratenses aos 103 DAS, i.e. no início da floração da serradela rosa. Verifica-se que o sistema cultural, a espécie vegetal e o tratamento fosfatado afetaram ($p < 0,001$) a produção de biomassa aérea, mas a biomassa radicular apenas foi afetada ($p < 0,05$) pelo nível de P. Sabe-se que a relação biomassa aérea/raiz é um importante indicador do estado nutritivo das plantas. Crusciol et al. (2005) verificaram que o crescimento radicular das leguminosas era muito afetado pela disponibilidade em P no solo, o que parece contradizer De Varennes (2003), que referiu que quando ocorre carência de P, o crescimento da planta é afetado, em particular a parte aérea, com uma diminuição da relação parte aérea/raiz.

Analisando o Quadro 3, verifica-se que, para o tratamento P0, a relação parte aérea/raiz (2,3) é idêntica à obtida para o tratamento P1 (2,2) mas inferior à dos tratamentos P2 (2,7) e P3 (3,0). Estes resultados confirmam o observado por De Varennes (2003), isto é, as plantas melhor nutridas em P produziram maior biomassa aérea comparativamente com a raiz. Comparando as espécies vegetais, o trevo subterrâneo apresentou a maior relação parte aérea/raiz (4,5), enquanto o azevém apresentou a menor relação (0,9), com uma produção de raiz superior à biomassa aérea.

Quadro 3. Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) do peso seco (g PS planta⁻¹) da biomassa aérea e radicular (nodulada, no caso das leguminosas) (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹)

Fonte de variação	Biomassa aérea (g PS planta ⁻¹)	Biomassa radicular (g PS planta ⁻¹)
Sistema cultural:		
Monocultura	1,43a	0,37a
Consociação	0,80b	0,49a
Espécie vegetal:		
Azevém anual	0,38b	0,43a
Trevo subterrâneo	1,48a	0,33a
Serradela rosa	1,48a	0,53a
Tratamento fosfatado:		
P0	0,60c	0,26b
P1	1,02bc	0,46ab
P2	1,58a	0,59a
P3	1,25ab	0,41ab
ANOVA	Valores de F	
Sistema cultural (S)	20,73 ***	ns
Espécie vegetal (V)	27,81 ***	ns
Tratamento fosfatado (P)	8,69 ***	3,48 *
Interações:		
S x V	50,17 ***	24,52***
S x P	2,80 *	ns
V x P	ns	ns
S x V x P	3,64 **	ns

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente para $p < 0,05$, de acordo com o teste de Bonferroni; ns, *, **, *** = Valores de F não significativos ($p \geq 0,05$), ou significativos para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente.

Biomassa aérea

No caso da monocultura, o trevo subterrâneo foi a espécie vegetal que melhor respondeu ($p < 0,05$) ao tratamento fosfatado (Fig. 10), obtendo um valor de biomassa aérea significativamente superior (3,9 g PS planta⁻¹) na dose P2, ainda que não seja diferente da biomassa produzida nas doses P1 e P3. A serradela rosa obteve uma produção de biomassa aérea semelhante à do trevo subterrâneo (2,8 g PS planta⁻¹), para o mesmo nível de P2, mas apenas em consociação (Fig.10). Estes resultados são sustentados por Krolow et al. (2004) que também verificaram que a aplicação de P proporcionou um aumento muito significativo na produção de matéria seca do trevo-vermelho e do trevo subterrâneo.

Chama-se à atenção para o facto de se ter verificado um fraco desenvolvimento do trevo em consociação devido ao grande desenvolvimento da parte aérea da serradela, levando a uma menor exposição solar por parte do trevo.

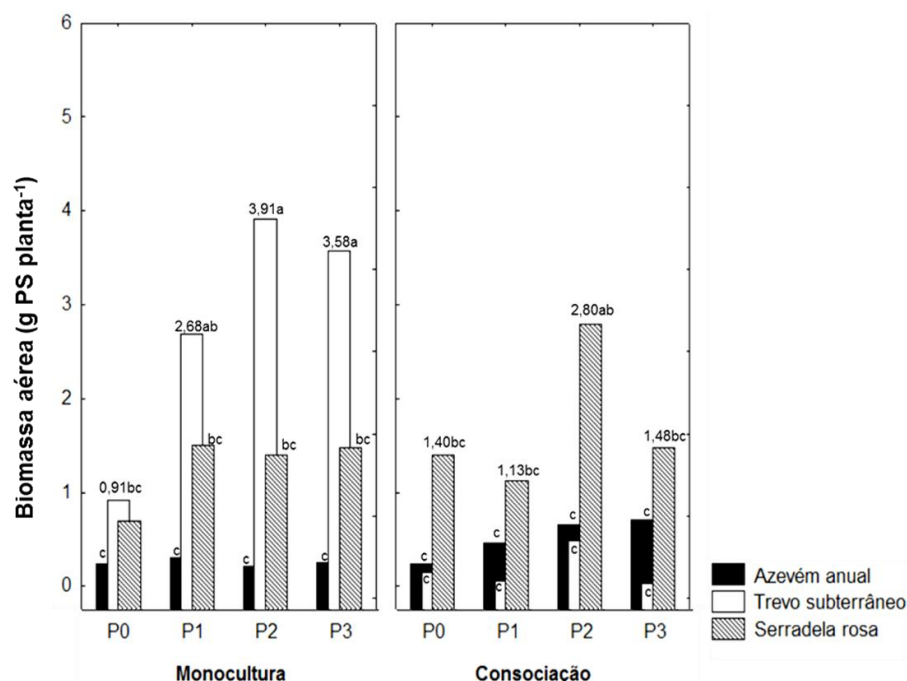


Fig. 10. Resultado da interação da biomassa aérea (g PS planta⁻¹) produzida pelas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) por efeito dos dois sistemas culturais (cultura estreme e consociação) e tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p < 0,05), de acordo com o teste de Bonferroni.

É importante lembrar que os resultados apresentados na Fig. 10 são expressos em g PS planta⁻¹ e que, em média, o trevo produziu três plantas por vaso (densidade de sementeira = 15 kg sementes ha⁻¹) e a serradela produziu oito plantas por vaso (densidade de sementeira = 20 kg sementes ha⁻¹). Quando se expressam os resultados da produção de biomassa aérea a kg PS ha⁻¹ resulta que o trevo produziu um valor equivalente a 7274 kg PS ha⁻¹ e a serradela 13926 kg PS ha⁻¹, ambos em monocultura, valores muito superiores aos referidos na bibliografia, para condições de campo (Volaire et al., 1992; Farinha et al., 1998; Iglesias e Lloveras, 2000; Perdigão, 2011; Fontaneli et al., 2012; Carranca et al., 2015). Para calcular a produção por hectare foi utilizada a seguinte expressão:

$$[X \text{ (g PS planta}^{-1}\text{)} * Y \text{ (n}^{\circ} \text{ plantas vaso}^{-1}\text{)} * ((10000 \text{ m}^2 * 0,15 \text{ (altura média dos vasos)} * 1,3 \text{ (densidade))} * 1000)] / 3 \text{ (kg solo vaso}^{-1}\text{)}, \quad (\text{eq. 5})$$

Assim, deve-se assumir que a serradela, ainda que tenha um peso seco por planta menor que o do trevo resulta numa maior produção por hectare dadas as densidades de sementeira usadas no estudo e que foram as recomendadas para as condições de campo.

Considerando o número médio de plantas produzidas (valores descritos no Material e Métodos), a produção da serradela rosa em consociação foi de 14424 kg PS ha⁻¹, não diferindo substancialmente da produção da cultura em monocultura.

A produção de biomassa aérea de azevém anual não variou significativamente em ambos os sistemas culturais, também não respondendo significativamente ao tratamento fosfatado. Isto pode dever-se à privação de N no solo, como referido anteriormente.

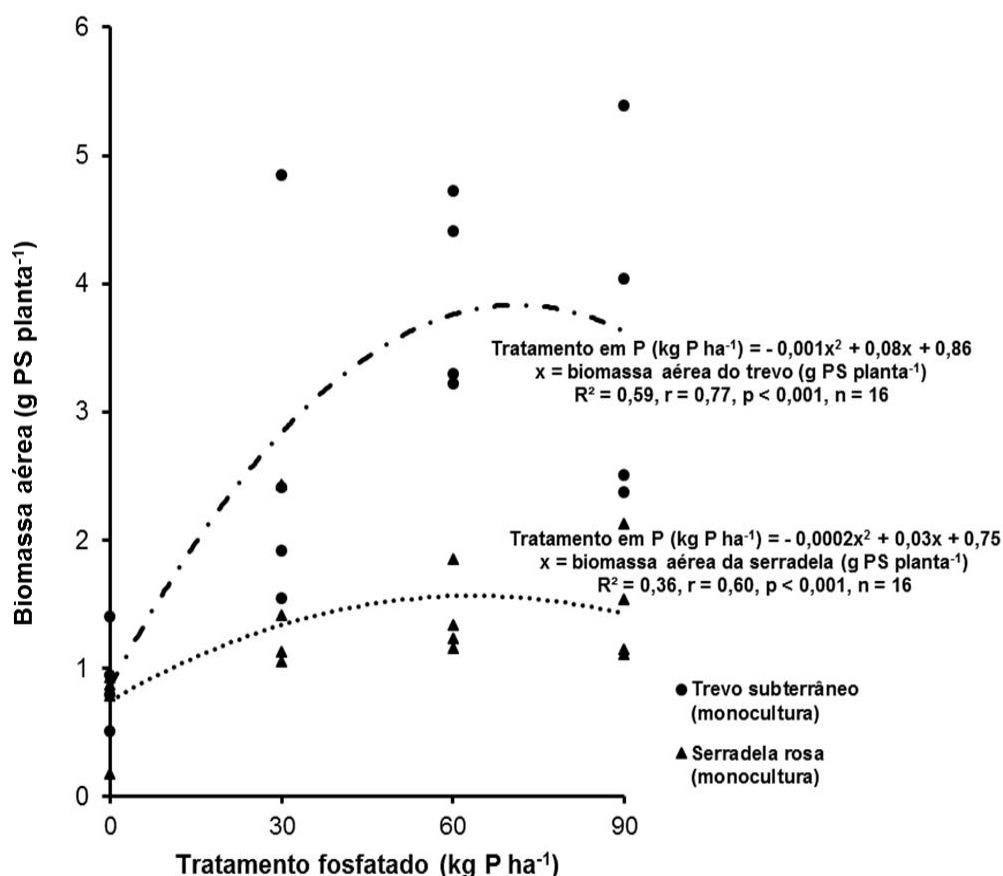


Fig. 11. Curvas polinomiais da produção de biomassa aérea das leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), em monocultura, e em resposta ao tratamento fosfatado.

Da observação da Fig. 11 verifica-se que, por adição de uma unidade de P são produzidos 0,06 g PS de trevo e 0,03 g PS de serradela, ou seja, o trevo subterrâneo produziu cerca do dobro da biomassa aérea por cada unidade de P adicionado, comparativamente com a serradela rosa. O resultado da Fig.11 parece indicar uma maior eficiência fisiológica do trevo na utilização do P adicionado, visto que o trevo produziu maior biomassa (por planta) que a serradela, quando cultivadas em monocultura (Quadro 3, Fig. 10). Este padrão está em concordância com os resultados relatados por Hart (1988) para o trevo branco.

Biomassa radicular

A dose P2 (60 kg P ha⁻¹) aumentou a produção média de biomassa radicular (Quadro 3) das três espécies vegetais produzindo o dobro do peso (0,59 g PS planta⁻¹) comparativamente com as plantas de controlo (0,26 g PS planta⁻¹).

Comparando os sistemas culturais (Fig. 12), a maior produção de raízes foi obtida na serradela rosa e azevém anual em consociação (0,73 g PS planta⁻¹), apenas ligeiramente superior à do trevo subterrâneo em monocultura. Em consociação, o trevo subterrâneo apresentou um peso radicular bastante reduzido, pelas razões mencionadas anteriormente relativamente à produção de biomassa aérea do trevo.

Também aqui há que ter em consideração que o valor de 0,64 g PS planta⁻¹ de trevo subterrâneo, em monocultura, corresponde a 1194 kg ha⁻¹ (PS) e o valor de 0,25 g PS planta⁻¹ de serradela, no mesmo sistema cultural, equivale a 1243 kg PS ha⁻¹. Também em consociação, a serradela rosa produziu maior biomassa radicular por hectare (3979 kg PS ha⁻¹), de acordo com as densidades de sementeira usadas e recomendadas na bibliografia.

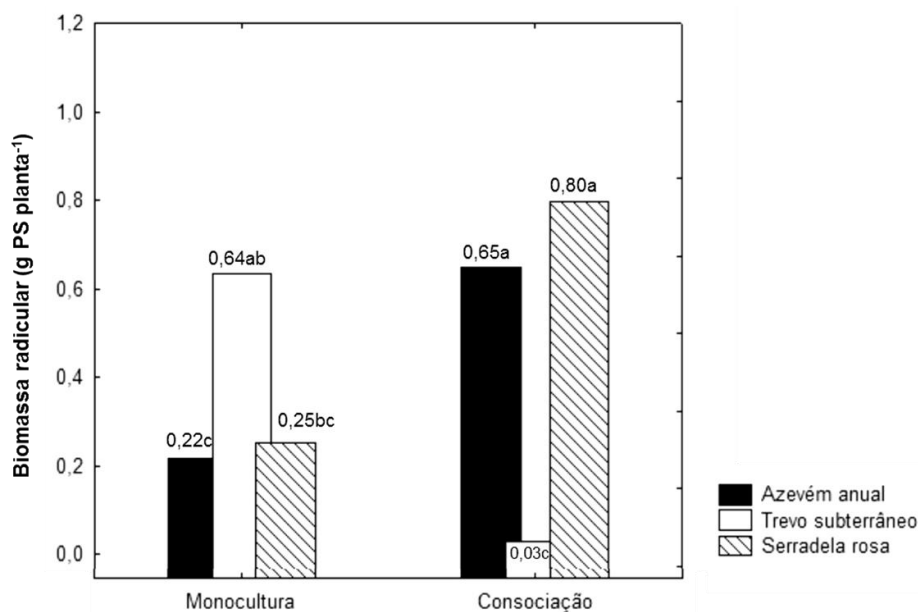


Fig. 12. Interação da biomassa radicular (g PS planta⁻¹) produzida pelas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa) em ambos os sistemas culturais (cultura estreme e consociação), por efeito médio do tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p < 0,05), de acordo com o teste de Bonferroni.

Os valores da biomassa aérea e radicular determinados neste estudo foram muito inferiores aos determinados por Krolow et al. (2004), respetivamente 15,6 e 4,2 g PS planta⁻¹ de trevo subterrâneo cultivado em vaso, como cultura estreme, provavelmente pela maior duração do ciclo vegetativo (fase de maturação) e, também, porque apenas semearam uma planta por vaso.

Nódulos rizobianos

A nodulação nas leguminosas é um processo bastante importante na fixação simbiótica do N₂, uma vez que este processo representa uma alternativa biológica para o fornecimento de N às plantas (Krussel et al., 2002). Trata-se de um processo natural que não causa nenhum dos problemas sócio - económicos e ambientais decorrentes do uso de adubos azotados, sendo todo o N₂ fixado utilizado pela planta fixadora. A captura e fixação do N₂ ocorrem nos nódulos radiculares resultantes da infeção rizobiana (De Varennes, 2003; Junior et al., 2010; Carranca, 2013).

No presente estudo, a presença de nódulos nas duas leguminosas foi detetada nove dias após a emergência das plantas. Nesta data, o trevo subterrâneo apresentava já bastantes nódulos enquanto a serradela estava ainda numa fase inicial, com nódulos visíveis, mas pequenos. Os nódulos estavam já ativos. Estas observações corroboram os resultados relatados por Hungria et al. (2001) e De Varennes (2013) que afirmaram que entre cinco a oito dias após a emergência das plantas já era possível observar os primeiros nódulos com tamanho apreciável. Por este motivo, a aplicação do adubo azotado enriquecido com ¹⁵N, usado para o estudo da fixação do N₂, foi correta, isto é foi aplicado uma semana após a germinação das leguminosas, no início do processo de fixação do N₂.

O número e biomassa dos nódulos produzidos neste estudo aumentaram até ao nível P2, não sendo significativamente diferentes do nível P3. Estes resultados estão de acordo com os de Othman et al. (1991) que verificaram que o número, o tamanho e o peso dos nódulos aumentava com o fornecimento de P até determinada concentração, consoante a espécie vegetal, sendo mais evidente na resposta da biomassa do que no número de nódulos. Neste trabalho, os autores verificaram que plantas de feijão-frade (*Vigna unguiculata* L.) apresentavam um número de nódulos semelhante aos do trevo subterrâneo do presente estudo, variando entre 50 a 70 nódulos por planta. Dentre as leguminosas estudadas por Krolow et al. (2004), o trevo subterrâneo e o lótus (*Nelumbo nucifera*) foram as plantas que apresentaram maior número de nódulos (mais de 40 nódulos/planta) e maior eficiência da nodulação.

Da observação do Quadro 4 verifica-se que a serradela rosa produziu maior número de nódulos (343 planta^{-1}), mas com menor peso seco ($20 \text{ mg PS planta}^{-1}$) que o trevo subterrâneo ($57 \text{ nódulos planta}^{-1}$ e $30 \text{ mg PS planta}^{-1}$). Em consociação, os valores observados devem-se, essencialmente, à nodulação da serradela uma vez que a nodulação do trevo foi muito reduzida. Neste sistema cultural, apenas no nível P2 o trevo apresentou 15 nódulos, sendo nulos nas outras modalidades. Como referido anteriormente, também a nodulação do trevo em consociação ficou prejudicada pelo grande desenvolvimento da biomassa aérea da serradela associada.

Como se pode observar na Fig. 13, o tratamento fosfatado afetou significativa e positivamente o número ($p < 0,05$) e o peso seco ($p < 0,01$) dos nódulos, com valores superiores na dose P2 (208 e $35 \text{ mg PS planta}^{-1}$), para o número e biomassa nos nódulos, respetivamente), contudo não diferindo da resposta ao nível P3.

Carvalho (2002) referiu que uma elevada nodulação resulta na formação de nódulos menores e, conseqüentemente, um menor peso seco. Este facto foi observado na serradela rosa do presente estudo, comparativamente com o trevo subterrâneo. No entanto, da observação dos nódulos formados no presente estudo concluiu-se que os que se formaram junto ao colo radicular, tanto no trevo subterrâneo como na serradela rosa, terão resultado da inoculação das sementes e apresentavam maiores dimensões, enquanto os distribuídos ao longo das raízes, em especial na serradela, eram pequenos, possivelmente resultando da infeção pela (s) bactéria (s) do solo.

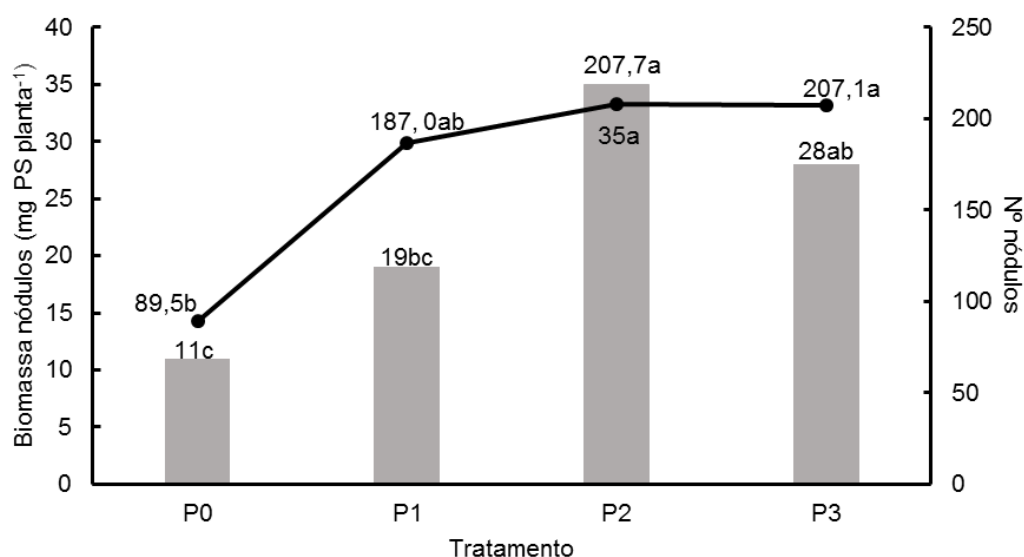


Fig. 13. Efeito do tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹) no número e peso seco (mg PS planta⁻¹) dos nódulos produzidos pelo trevo subterrâneo e serradela rosa quando cultivados como culturas estremes e em consociação; (barras = peso seco; linha = nº nódulos); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni

Quadro 4. Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) do número, biomassa (mg planta⁻¹ (PS)), teor de P total (g P kg⁻¹ PS), P exportado (mg P planta⁻¹ (PS)) e teor de N total (g N kg⁻¹ PS), relação N/P, excesso de átomos de ¹⁵N (%), %Nda e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nos nódulos das leguminosas cultivadas em ambos os sistemas culturais (monocultura e consociação), por efeito do tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹)

Fonte de variação	Nº nódulos/planta	Biomassa nos nódulos (mg planta ⁻¹ (PS))	P total nos nódulos (g P kg ⁻¹ (PS))	P exportado nos nódulos (mg P planta ⁻¹ (PS))	N total nódulos (g N kg ⁻¹ (PS))	Relação N/P	Excesso de átomos ¹⁵ N (%)	Nda (%)	N ₂ fixado (mg N planta ⁻¹ (PS))
Espécie vegetal:									
Trevo (monocultura)	57b	30a	4,12a	0,160a	59,3b	12,6c	0,050a	86,4c	1,53ab ⁽¹⁾
Serradela (monocultura)	343a	20b	2,67b	0,037b	68,9a	32,7a	0,031b	91,5b	0,96b
Consociação	118b	30ab	2,26b	0,076b	66,6a	18,7b	0,017c	95,4a	1,69a
Tratamento:									
P0	90b	11c	0,90c	0,018b	62,2b	28,5a	0,043a	88,2b	0,63b
P1	187ab	20bc	2,47b	0,052b	68,22a	22,4b	0,030b	91,7a	1,13ab
P2	208a	35a	3,94a	0,158a	62,7b	17,1b	0,028b	92,4a	2,13a
P3	207a	28ab	4,34a	0,138a	66,7a	17,2b	0,029b	92,0a	1,68a
ANOVA	Valores de F								
Espécie vegetal (V)	40,70***	4,72*	28,15***	15,57***	35,70***	68,80***	149,20***	149,20***	ns
Tratamento (P)	4,26*	6,54**	47,03***	13,01***	9,51***	14,14***	21,10***	21,10***	6,27**
Interação	ns	ns	ns	3,18*	ns	ns	ns	ns	ns

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente para $p < 0,05$, de acordo com o teste de Bonferroni, com exceção de ⁽¹⁾ onde foi aplicado o teste de Fisher; ns, *, **, *** = valores de F não significativos ($p \geq 0,05$), ou significativos para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente.

4.3. Concentração de P na biomassa das plantas

Biomassa aérea e radicular

Da observação do Quadro 5, e considerando o efeito médio dos órgãos das plantas verifica-se que as maiores concentrações de P total nas espécies pratenses foram obtidas nos tratamentos P2 e P3, sendo a maior obtida no trevo subterrâneo, em monocultura ($2,67 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$), seguida da serradela rosa no mesmo sistema cultural ($2,18 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$). Estes valores foram quase o triplo dos obtidos para as plantas de controlo e inserem-se no intervalo de valores determinados por Jordan (2011) para a parte aérea de duas variedades de trevo ($0,79$ e $2,88 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$). Também De Varennes (2003) referiu como adequados os valores $2 - 5 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$ na biomassa aérea. Por seu lado, Epstein & Bloom (2006) verificaram que $2 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$ era o limite inferior para uma adequada concentração de P na parte aérea das leguminosas. No entanto, Othman et al. (1991) consideraram os teores compreendidos entre $0,81$ e $2,60 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$ muito baixos. Estes autores consideraram, provavelmente, a planta completa, onde os nódulos são o principal sumidouro de P, como adiante se verá (Quadro 4). No presente estudo, sendo as plantas cultivadas em vasos, todo o P adicionado encontrava-se confinado ao vaso e disponível para utilização pelas culturas, não tendo sido perdido por lixiviação (o ocasional lixiviado era repostado no vaso) e/ou escorrência superficial, sendo, pois, de crer que os presentes teores são adequados para a biomassa aérea de ambas as leguminosas.

Considerando o efeito médio dos órgãos da planta (parte aérea e raiz sem nódulos) e do tipo de sistema cultural (Quadro 5), o valor de P exportado nas plantas P2 e P3 ($5,15 \text{ mg P planta}^{-1} \text{ (PS)}$) apresentou um aumento considerável, quase 8 vezes superior ao das plantas produzidas na ausência de adubação fosfatada ($0,69 \text{ mg P planta}^{-1} \text{ (PS)}$).

Comparando os teores de P na biomassa aérea e raiz (não nodulada) das espécies pratenses em ambos os sistemas culturais, e considerando o efeito médio do tratamento fosfatado (Fig. 14), verifica-se que a concentração de P é idêntica em ambos os órgãos das plantas leguminosas quando cultivadas como culturas estremes, mas o mesmo não se verificou em consociação, sendo superior na biomassa aérea.

Em ambos os órgãos (parte aérea e raiz), o azevém apresentou concentrações de P bastante inferiores às das leguminosas, e significativamente

menores na raiz ($1 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$), em ambos os sistemas culturais (Fig. 14). Além de uma menor exigência em P comparativamente com as leguminosas fixadoras, este resultado pode também ser consequência de alguma carência azotada da gramínea.

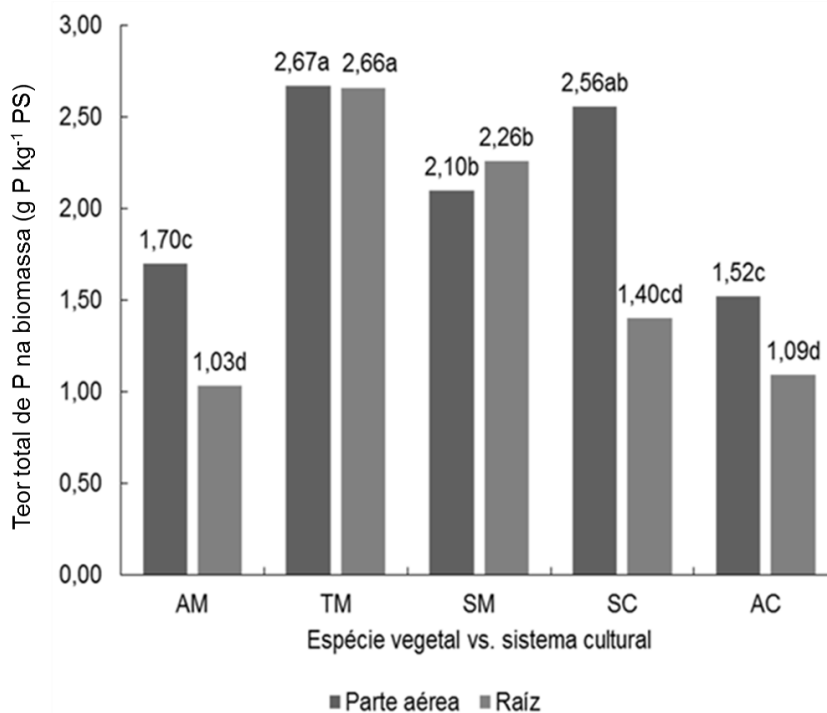


Fig. 14. Efeito da interação das espécies pratenses e sistemas culturais (azevém anual (A), trevo subterrâneo (T) e serradela rosa (S)) em monocultura (M) e consociação (C) nos teores de P total ($\text{g P kg}^{-1} \text{ PS}$) da parte aérea e raiz (não nodulada) das espécies pratenses, na ausência de resposta ao tratamento fosfatado; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni.

Analisando a relação N/P na biomassa (Quadro 5), não se verificaram diferenças significativas entre a parte aérea e a parte radicular (11,6). No entanto, entre espécies observaram-se diferenças, sendo de destacar a maior relação N/P no caso da serradela rosa em monocultura (15), estatisticamente idêntica à obtida quando cultivada em consociação (considerando o efeito médio dos órgãos da planta, excluindo os nódulos). É possível que este facto seja uma consequência da inoculação da espécie com a bactéria *Bradyrhizobium* spp., de crescimento lento e, por conseguinte, menos exigente em P para a fixação simbiótica (Bolland & Baynter, 1992; Ovalle et al., 2006; Carranca, 2013; Weisany, 2013), comparativamente com o trevo subterrâneo inoculado com o *Rhizobium leguminosarum*, de crescimento rápido, o que torna a serradela rosa em simbiose mais adequada para solos pobres em P. Também o seu longo sistema radical faz

com que a serradela seja mais eficiente na absorção do P (Ovalle et al., 2006; Gonçalves, 2015).

Quadro 5. Comparação de médias e resultados da Análise de Variância (ANOVA) da concentração de P e N (g kg^{-1} PS), e respetiva relação, para ambos os órgãos da planta (parte aérea e raiz não nodulada) e teores de P exportado (mg P planta^{-1} (PS)), enriquecimento em ^{15}N (%enriq. ^{15}N) e excesso de átomos de ^{15}N (%exc.át. ^{15}N) nas espécies pratenses (azevém anual, trevo subterrâneo e serradela rosa), em ambos os sistemas culturais (monocultura e consociação) e, em resposta ao tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha^{-1})

Fonte de variação	P total	N total	P exp.	Relação N/P	Enriq. ^{15}N	Exc.át. ^{15}N
	-----(g kg^{-1})-----	(mg planta^{-1} (PS))	-	(%)	(%)	
Espécie vegetal:						
Azevém	1,37d	6,447d	0,42d	6,0c	0,837a	0,471a
Trevo	2,67a	29,21a	8,13a	12,1b	0,482b	0,115b
Serradela	2,18b	28,61a	2,95c	15,0a	0,449b	0,083b
Serradela + Trevo	1,93c	22,76b	4,38b	14,1a	0,490b	0,124b
Azevém	1,30d	8,83c	0,90d	8,7c	0,784b	0,417a
Tratamento:						
P0	0,97c	17,34b	0,69c	19,0a	0,645a	0,279a
P1	1,72b	19,26a	2,45b	11,5b	0,586b	0,220b
P2	2,30a	20,06a	5,17a	8,2c	0,608ab	0,242ab
P3	2,55a	20,07a	5,12a	7,5c	0,595ab	0,422ab
Órgão da planta:						
Parte aérea	2,09a	20,48 ^a	ns	11,2a	0,611a	0,245a
Parte radicular	1,69b	17,88b	ns	11,9a	0,606a	0,240a
ANOVA						
Valores de F						
Espécie vegetal (V)	100,8***	898,0***	84,11***	51,70***	138,9***	138,9***
Tratamento (P)	190,00***	15,7***	51,99***	98,24***	3,4*	3,4*
Órgão planta (O)	61,90***	58,1***	ns	ns	ns	ns
Interações:						
V x P	9,0***	4,6***	11,94***	7,57***	ns	ns
V x O	18,7***	32,8***	ns	6,56***	18,2***	18,2***
P x O	14,8***	7,7***	ns	ns	ns	ns
V x P x O	ns	3,9***	ns	4,75***	ns	ns

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni; ns, *, *** = valores de F não significativos ($p \geq 0,05$), ou significativos para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respetivamente.

A menor relação N/P no trevo, em monocultura (12), relativamente à serradela no mesmo sistema cultural (Quadro 5), é o resultado de uma maior absorção de P do solo, tal como se pode verificar pela maior concentração de P na parte aérea da planta ($2,67 \text{ g P kg}^{-1}$ PS) e maior quantidade de P exportado na planta ($8,13 \text{ mg P planta}^{-1}$ (PS)), comparativamente com os menores teores na serradela ($2,18 \text{ g kg}^{-1}$ PS e $2,95 \text{ mg planta}^{-1}$ (PS)), respetivamente para a concentração e exportação, em monocultura, ou $4,38 \text{ mg P planta}^{-1}$ (PS) em consociação).

Da observação da curva de regressão (Fig. 15) resultante do ajustamento dos resultados da biomassa aérea produzida pelas espécies pratenses em ambos os sistemas culturais em resposta ao tratamento fosfatado e a respetiva concentração de P ($\text{g P kg}^{-1} \text{ PS}$) = $-0,139 * x^2 + 1,033 * x + 1,989$, x = peso seco da parte aérea (g PS planta^{-1}), $R^2 = 0,35$, $r = 0,59$, $p < 0,001$), demonstra-se que o trevo subterrâneo produziu mais biomassa aérea que a serradela rosa para os mesmos teores de P na planta mas o modelo apenas permite explicar 35% da variação da biomassa. Idêntica relação foi observada entre os valores SPAD e os teores de N total na biomassa aérea (Fig. 9). Considerando a maior produção de biomassa aérea pelo trevo subterrâneo, o P exportado nesta leguminosa foi o dobro da serradela, deste modo confirmando o referido por Bolland & Paynter (1992).

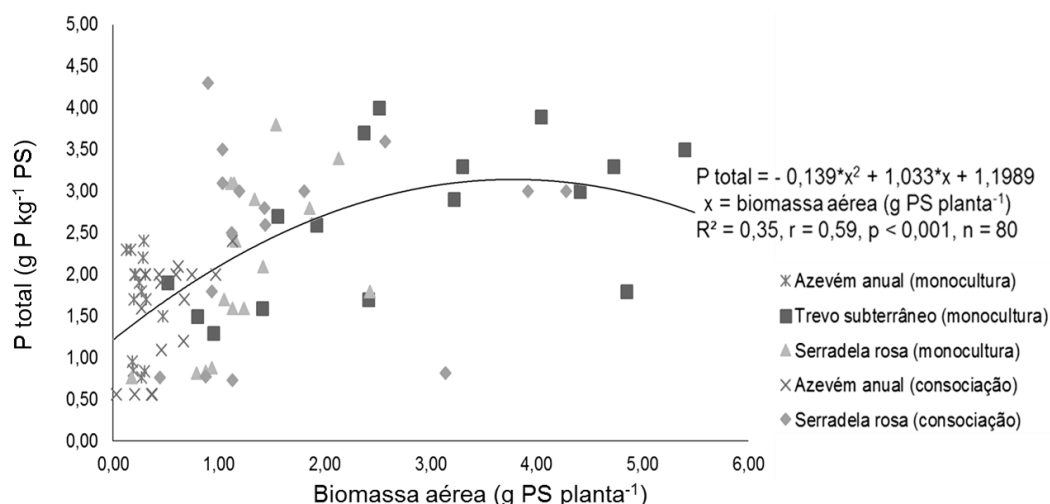


Fig. 15. Ajustamento de uma curva polinomial aos resultados da biomassa aérea (g PS planta^{-1}) e a concentração de P total ($\text{g P kg}^{-1} \text{ PS}$) nas espécies pratenses, em monocultura e consociação, em resposta ao tratamento fosfatado ($R^2 = 0,35$, $r = 0,59$, $p < 0,001$, $n = 80$).

Nódulos rizobianos

No presente estudo, a concentração de P nos nódulos das leguminosas teve o mesmo padrão de resposta que a parte aérea e as raízes (não noduladas), isto é, aumentou com o acréscimo da dotação de P até ao nível P2 (Fig. 16), mantendo-se constante no nível P3. Idêntico resultado foi observado por Krolow et al. (2004). A concentração média de P ($4,1 \text{ g P kg}^{-1} \text{ PS}$) e o teor médio de P exportado ($0,160 \text{ mg P planta}^{-1} \text{ (PS)}$) nos nódulos foram superiores no trevo subterrâneo comparativamente à serradela rosa (Quadro 4). A concentração média de P nos nódulos do trevo foi cerca do dobro do observado nos outros órgãos (parte aérea e

raiz não nodulada) das duas plantas leguminosas. Nos nódulos da serradela não se verificaram diferenças substanciais entre órgãos.

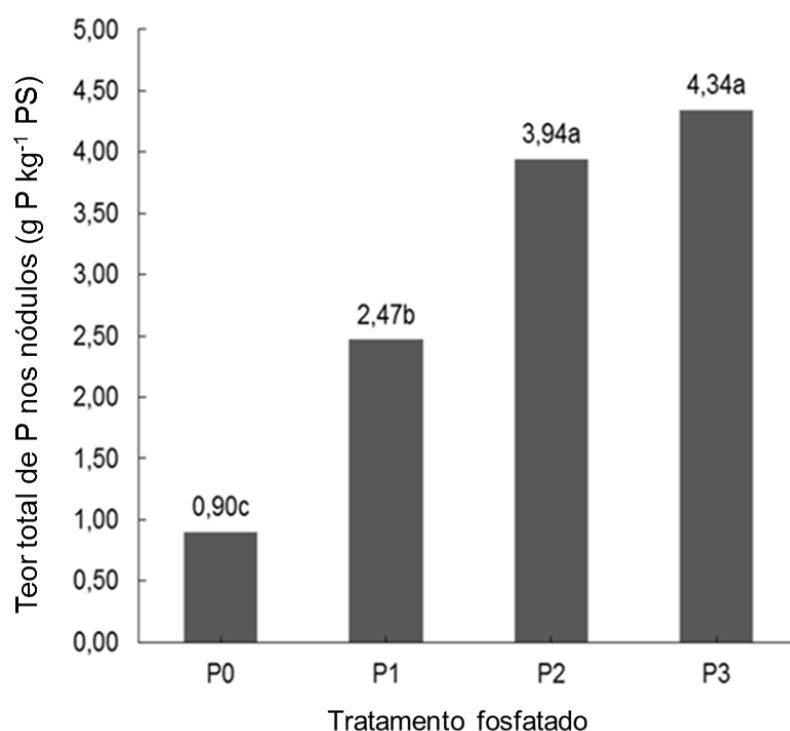


Fig. 16. Teores médios de P total (g P kg⁻¹ PS) nos nódulos rizobianos das leguminosas (trevo subterrâneo e serradela rosa) cultivadas em monocultura e consociação e em resposta ao tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni.

No que diz respeito à relação N/P nos nódulos, a serradela rosa apresentou o valor mais elevado (32,7), comparativamente com o trevo subterrâneo (12,6). As doses P1, P2 e P3 não fizeram variar significativamente a relação N/P nos nódulos das leguminosas (18,9), significativamente inferior ao das plantas do controlo (28,5). A relação N/P nos órgãos das leguminosas não tem sido descrito na bibliografia, considerando-se estes resultados inéditos. A maior relação N/P nos nódulos da serradela parece confirmar a maior eficiência no uso do P dos nódulos para uma maior captura e fixação de N nos mesmos, resultante do processo simbiótico. A menor relação N/P no trevo parece indicar uma menor taxa de fixação do N no nódulo, comparativamente com a serradela, por menor consumo de P durante esse processo.

4.4. Fixação simbiótica do N₂ pelas leguminosas

Excesso de átomos ¹⁵N nas plantas

Relativamente ao excesso de átomos de ¹⁵N (%) verifica-se no Quadro 5 que o azevém apresentava um enriquecimento em átomos de ¹⁵N significativamente superior (0,471%) ao das leguminosas. A gramínea não tem capacidade para captar o N₂ atmosférico e a relação ¹⁴N/¹⁵N medida na sua biomassa resulta fundamentalmente da absorção do ¹⁴N/¹⁵N do solo, em especial do adubo azotado enriquecido com 5% de átomos de ¹⁵N, não tendo sido diluído pelo ¹⁴N da atmosfera, como acontece com as leguminosas fixadoras. As leguminosas diluem a relação ¹⁴N/¹⁵N na sua biomassa com a do N₂ captado da atmosfera. A gramínea é também mais eficiente na absorção do N do solo que as leguminosas fixadoras, pelo que estas são obrigadas a captá-lo da atmosfera suprimindo, deste modo, grande parte das suas necessidades azotadas.

Teor de N₂ fixado

Biomassa aérea e radicular

Considerando os efeitos médios dos órgãos da planta e do tratamento fosfatado, a espécie vegetal que apresentou maior %Nda foi a serradela rosa, em monocultura (81% Nda) (Quadro 6). A %Nda no trevo subterrâneo foi idêntica ao valor da consociação e idêntico ao valor máximo (72%) estimado por Carranca et al. (1999 e 2015) em pastagens Mediterrânicas melhoradas, e semelhante ao menor valor (74 – 91%) determinado por Ovalle et al. (2006) em condições sub-húmidas do Chile. Ambas as taxas de fixação simbiótica são consideradas elevadas.

Quando não se aplicou P ao solo (P0), as leguminosas captaram ($p < 0,001$) menos N₂ atmosférico (65,4% Nda) comparativamente com as dotações de P1, P2 ou P3, onde o teor de %Nda para ambas as leguminosas não diferiu significativamente (77% Nda). Estes resultados estão em concordância com Hart (1989), que verificou que um maior fornecimento de P inorgânico ao trevo branco aumentou a atividade da nitrogenase nas raízes noduladas, ou seja, aumentou a fixação do N₂. O valor de Nda determinado no presente estudo indica que um

máximo de 23% do N nas plantas, em monocultura ou em consociação, não proveio da atmosfera, resultando, porventura, da absorção do N do solo e da semente.

Quadro 6. Comparação de médias e resultado da Análise de Variância (ANOVA) dos teores de N derivado da atmosfera (%Nda) e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) pelas leguminosas pratenses, em ambos os órgãos das plantas (parte aérea e raiz sem nódulos), quando cultivadas como culturas estremes ou em consociação e em resposta ao tratamento fosfatado. (tratamento: P0 = 0; P1 = 30; P2 = 60; P3 = 90 kg P ha⁻¹)

Fonte de variação	Nda (%)	N ₂ fixado (mg N planta ⁻¹ (PS))
Espécie vegetal:		
Trevo (monocultura)	72,7b	44a
Serradela (monocultura)	81,3a	20b
Consociação	68,1b	25b
Tratamento:		
P0	65,4b	11c
P1	74,8a	26b
P2	78,5a	49a
P3	77,3a	34b
Órgão da planta:		
Parte aérea	87,4a	52a
Parte radicular	60,6b	7b
ANOVA	Valores de F	
Espécie vegetal (V)	11,6***	15,2***
Tratamento (P)	6,9***	18,0***
Órgão planta (O)	139,8***	146,4***
Interações:		
V x P	2,5*	3,6**
V x O	13,6***	8,3**
P x O	ns	13,3***
V x P x O	ns	3,4**

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni; ns, *, **, *** = valores de F não significativos ($p \geq 0,05$), ou significativos para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente.

Ainda da observação do Quadro 6, o trevo subterrâneo foi a espécie vegetal que apresentou maior quantidade de N₂ fixado (44 mg N planta⁻¹ (PS), para os efeitos médios dos órgãos da planta e da dotação de P) quando cultivado como cultura estreme. Este valor é semelhante ao determinado por Chalk et al. (2010) para o trevo branco, também cultivado como estreme. Na serradela, foram fixados 20 mg N planta⁻¹ (PS), no mesmo sistema cultural, idêntico ($p < 0,001$) ao das leguminosas em consociação (25 mg N planta⁻¹ (PS)). Se tivermos em consideração o número de plantas produzidas por vaso, e de acordo com as densidades de sementeira recomendadas na bibliografia e usadas no presente ensaio, a serradela rosa fixou 99 kg N ha⁻¹ e o trevo subterrâneo 82 kg N ha⁻¹. Estes resultados estão

em conformidade com os de Ovalle et al. (2006) e Del Pozo e Ovalle (2009) que observaram que, em monocultura, a serradela amarela (*O. compressus* L.) fixava mais N_2 (91 kg N ha⁻¹) do que o trevo subterrâneo (59,3 kg N ha⁻¹), mas contradizem a teoria de que as leguminosas em monocultura fixam menos N_2 atmosférico, por não terem de competir pelo N do solo com plantas não leguminosas. Este facto pode ser explicado pelo baixo teor de N no presente solo, obrigando as leguminosas, em qualquer das situações, a captá-lo da atmosfera. Carranca et al. (2015) estimaram apenas 23 – 40 kg N ha⁻¹ fixado na biomassa aérea de pastagens melhoradas em que o trevo subterrâneo era a leguminosa dominante em regiões do Alentejo.

Em consociação, e tendo em conta que em média existiam quatro plantas de serradela e uma de trevo por vaso, a quantidade de N_2 fixado foi equivalente a 62 e 16 kg N ha⁻¹, respetivamente para cada espécie, num total de 78 kg N ha⁻¹ na consociação.

Os dois órgãos da planta (parte aérea e raiz não nodulada) responderam de modo distinto ($p < 0,001$) no que respeita ao teor de N_2 fixado (Fig. 17). Na biomassa aérea, o maior teor de N_2 fixado (114,3 mg N planta⁻¹ (PS), equivalente a 196 kg N ha⁻¹) foi observado no trevo subterrâneo, por aplicação de 60 e 90 kg P ha⁻¹, não diferindo significativamente da consociação no nível P2 (Fig. 17).

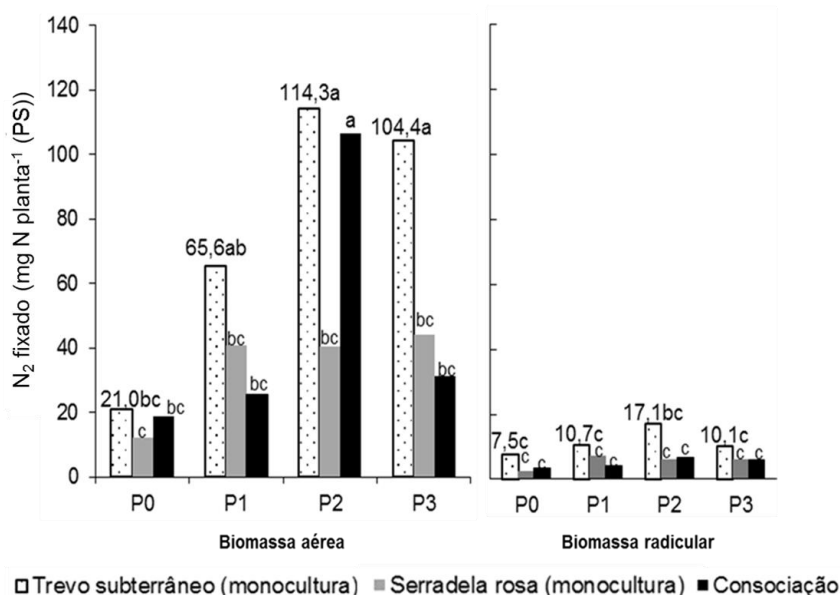


Fig. 17. Teores de N_2 fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) na biomassa aérea e radicular por efeito da interação entre as leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), o sistema cultural (monocultura e consociação) e o tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni.

A quantidade de N_2 fixado aumentou quase o dobro do tratamento P1 para o P2. Nas raízes não noduladas, o teor de N_2 fixado não variou significativamente nas duas leguminosas, por efeito do tratamento fosfatado, sendo sempre muito baixo. Neste órgão da planta, apesar do trevo subterrâneo apresentar o maior valor em monocultura, por efeito do P2 ($17,1 \text{ mg planta}^{-1}$ (PS)), equivalente a 36 kg N ha^{-1}), este não foi significativamente diferente do obtido para a serradela rosa, tanto em monocultura como em consociação.

Nódulos rizobianos

Da observação do Quadro 4, para o efeito médio das espécies pratenses e do tratamento fosfatado, os nódulos das leguminosas em consociação registaram o maior teor de Nda (95%) e, consequentemente, de N_2 fixado ($1,7 \text{ mg N planta}^{-1}$ (PS)), comparativamente com a monocultura. Em consociação verificou-se ainda menor concentração de P ($2,26 \text{ g P kg}^{-1}$ PS) e de P exportado nos nódulos ($0,076 \text{ mg P planta}^{-1}$ (PS)), idênticos aos da serradela em monocultura. Isto pode ser explicado pelo facto de o P ser indispensável ao processo de fixação simbiótica tendo sido utilizado para obtenção de energia durante o processo de fixação do N_2 . Pode também significar uma menor exigência em P pela serradela rosa, com menor absorção do nutriente comparativamente ao trevo subterrâneo.

Da observação da Fig. 18, e assumindo os efeitos médios das espécies vegetais e sistema cultural, verifica-se que os tratamentos P2 e P3 conduziram aos maiores aumentos de N_2 fixado ($1,9 \text{ mg N planta}^{-1}$ (PS)) e de P exportado nos nódulos ($0,15 \text{ mg P planta}^{-1}$ (PS)), não significativamente diferentes entre si. Foi também nas dotações P2 e P3 que se quantificaram os maiores números de nódulos, significativamente idênticos entre si (208) (Quadro 4). Estes resultados confirmam os de Othman et al. (1991), que verificaram que do aumento da nodulação resultava um aumento da fixação simbiótica. Os resultados do presente estudo confirmam também os obtidos por Chalk et al. (2010) que verificaram que a deficiência em P limita a produção de peso seco e número de nódulos, o que consequentemente resulta numa menor taxa de fixação simbiótica.

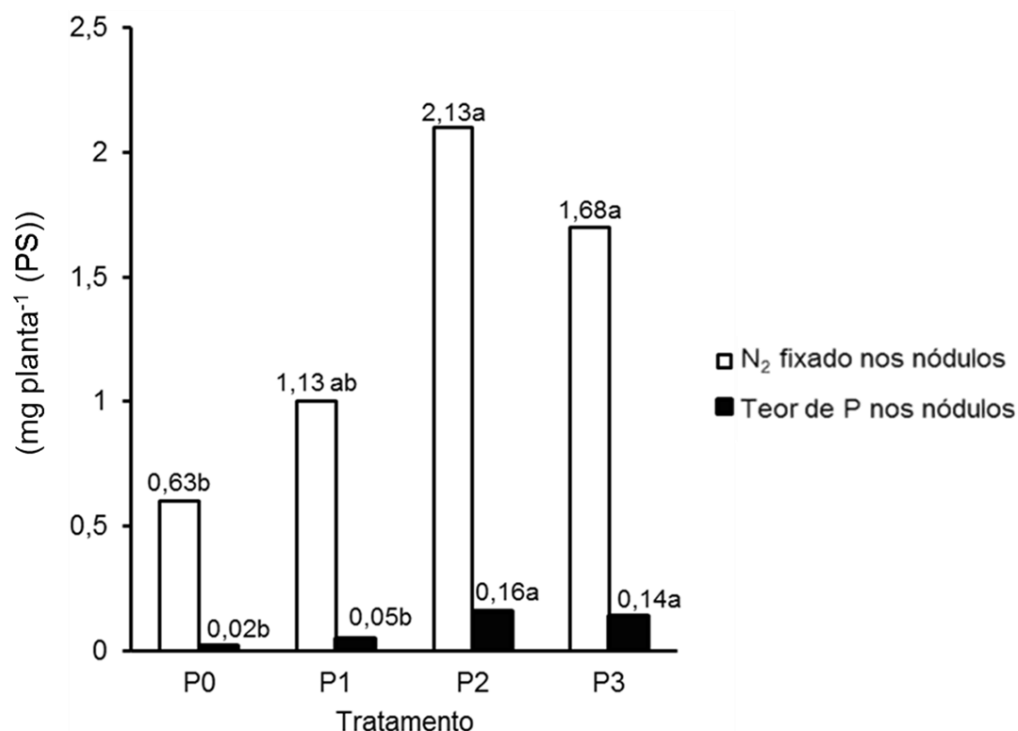


Fig. 18. Teores de N₂ fixado e de P exportado (mg planta⁻¹ (PS)) nos nódulos rizobianos das leguminosas (trevo subterrâneo e serradela rosa) em resposta ao tratamento fosfatado (P0 = 0, P1 = 30, P2 = 60, P3 = 90 kg P ha⁻¹) assumindo o efeito médio do sistema cultural (monocultura e consociação); médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni.

Planta completa

Da observação da Fig. 19 verifica-se que a planta completa de trevo subterrâneo fixou um total de 88,5 mg N planta⁻¹ (PS). Seguiram-se as leguminosas em consociação (maioritariamente serradela), com um total de N₂ fixado nas plantas completas de 52,7 mg N planta⁻¹ (PS), e por último a serradela, em monocultura, com um valor de 41,1 mg N planta⁻¹ (PS). A figura demonstra a partição do N₂ fixado nos três órgãos das plantas, com maiores quantidades medidas na biomassa aérea, função da produção de maior biomassa, seguida das raízes e nódulos.

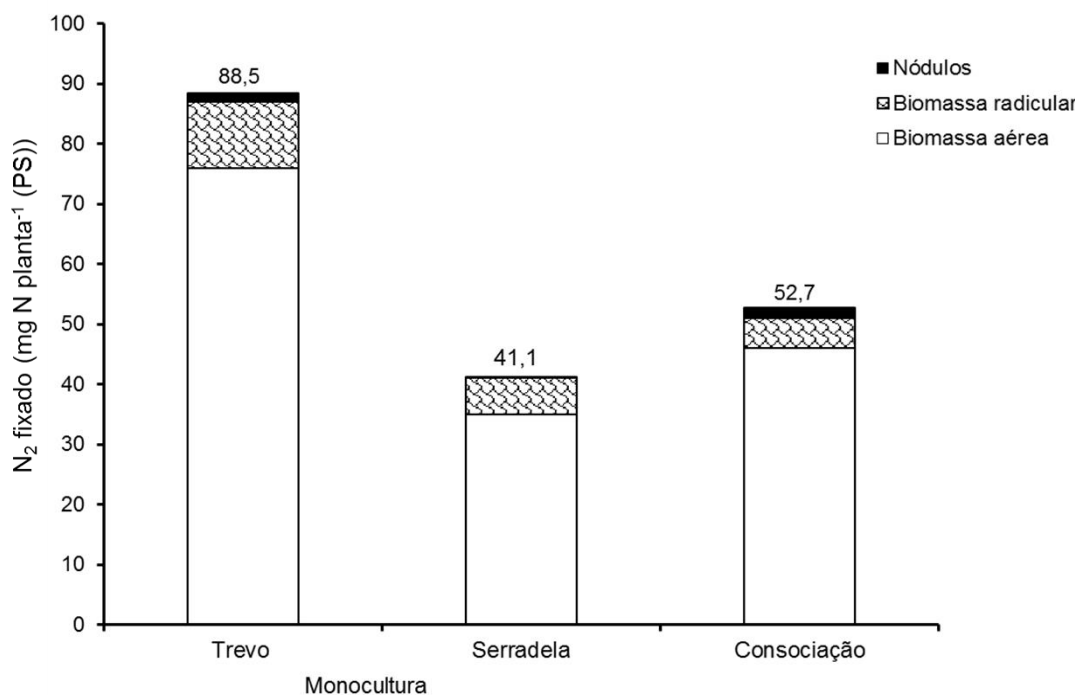


Fig. 19. Partição dos teores de N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nos diferentes órgãos (biomassa aérea, biomassa radicular e nódulos rizobianos) das leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), em monocultura e em consociação, assumindo o efeito médio do tratamento fosfatado.

Relação entre as leituras SPAD e os teores de N₂ fixado

Ajustando os resultados do N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) determinados na parte aérea das leguminosas e as leituras SPAD medidas na 2^a data (Fig. 20) obteve-se uma regressão linear (N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) = 1,038 + 1,726*SPAD, R² = 0,28, r = 0,53, p < 0,001, n = 48), onde apenas 28% da variação do N₂ fixado são explicados pelo modelo. Para esta regressão, excluíram-se as leituras SPAD do trevo em consociação dado o reduzido número de plantas germinadas. Importa referir que não foi encontrada qualquer referência bibliográfica relativa ao ajustamento dos dados das leituras SPAD com os teores de N₂ fixado, sendo estes resultados inéditos.

O trevo subterrâneo, em monocultura, foi a leguminosa pratense que registou maiores leituras SPAD (30 – 45) a que correspondeu uma grande amplitude de variação dos teores de N₂ fixado (< 20 – 140 mg N planta⁻¹ (PS)), em função da dotação de P. A serradela rosa, em monocultura e consociação,

apresentou valores de N₂ fixado idênticos aos do trevo (< 20 - 120 mg N planta⁻¹ (PS)), mas a que corresponderam menores leituras SPAD (9 – 29).

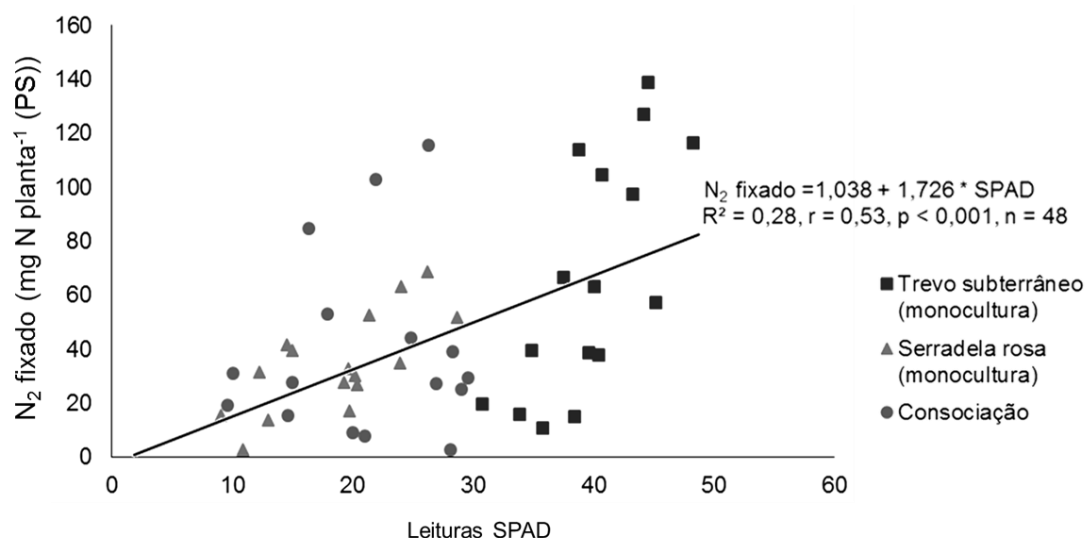


Fig. 20. Regressão linear entre as leituras SPAD e os teores de N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nas leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa) cultivadas em monocultura e consociação ($R^2 = 0,28$, $r = 0,53$, $p < 0,001$, $n = 48$).

Apesar de o modelo apresentar um fraco ajustamento dos dados demonstra que, de um modo geral, menores teores de N₂ fixado correspondem a menores taxas fotossintéticas (serradela rosa), mas para o trevo subterrâneo esta afirmação não é completamente verdadeira. O fraco ajustamento dos dados pode ter diversas causas, designadamente, as diferenças entre espécies leguminosas, com diferentes tipos de folhas e diferente intensidade da cor, mas também, possivelmente, em consequência das diferentes bactérias rizobianas associadas, e por ter sido usada toda a biomassa aérea para determinação do N₂ fixado, e não apenas as folhas como foi o caso das leituras - SPAD.

4.5. Teor de P extraível no solo

Sabe-se que as plantas leguminosas exigem mais P que as plantas não leguminosas, fertilizadas com N mineral e que esta maior exigência em P pelas leguminosas fixadoras do N₂ atmosférico deve-se ao envolvimento do P no processo de transferência de energia que ocorre no nódulo rizobiano (Sulieman et al., 2008; Carranca, 2013), mas também para uma maior atividade fotossintética da

planta. Em condições de deficiência de P no solo, a fixação simbiótica do N_2 será, pois, reduzida, porque a atividade do bacteróide e a formação e funcionamento dos nódulos são afetados. Nestas condições, a adição de P como *starter* deverá resultar num aumento do número de nódulos ativos e/ou do seu peso, aumentando, consequentemente, a taxa de fixação simbiótica, por planta e por nódulo (Davies, 1997), como demonstrado neste estudo.

Assim, além da análise química do material vegetal também se analisou quimicamente o solo após a colheita das plantas, nomeadamente quanto ao teor de P extraível. Esta determinação permitiu avaliar o teor residual do elemento no solo (0 – 20 cm) e a quantidade do nutriente que foi absorvida pelas plantas.

Da observação do Quadro 1, verifica-se que o teor médio de P no solo era de cerca de $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$, equivalente a $4,8 \text{ kg P ha}^{-1}$, considerando uma densidade aparente de 1,2. Da observação do Quadro 7, verifica-se que a adubação fosfatada afetou ($p < 0,001$) o P extraível no solo após a colheita das plantas, principalmente nas modalidades P2 e P3, onde se mediram os maiores teores no solo, não significativamente diferentes entre si (17 mg P kg^{-1} , equivalente a 32 kg P ha^{-1}).

Comparativamente com a concentração de P extraível do solo no início do ensaio verificou-se um aumento de cerca do dobro do P residual nos vasos do controlo, sem adição de P, uma vez que passou de, aproximadamente, $2,6 \text{ mg P kg}^{-1}$ (equivalente a $4,8 \text{ kg ha}^{-1}$) para $5,1 \text{ mg P kg}^{-1}$ (equivalente a $9,5 \text{ kg ha}^{-1}$). Este aumento do P extraível no solo na modalidade P0, comparativamente com o teor inicial talvez se possa explicar pela exsudação radicular, em especial pelas hifas micorrízicas (dados não apresentados). Também a micorrização pode ter disponibilizado algum P do solo. Aliás, os resultados do presente estudo corroboram os obtidos por Raimundo et al. (2015) num soute, em que a instalação de uma pastagem melhorada com trevo subterrâneo conduziu a uma melhoria do estado nutricional das árvores (castanheiro) no respeitante ao fósforo.

A maior concentração de P extraível no solo verificou-se nos vasos de azevém em monocultura ($14,4 \text{ mg P kg}^{-1}$, isto é, aproximadamente 27 kg P ha^{-1}) (Quadro 7), possivelmente por se tratar de uma gramínea, e portanto, menos exigente em P que as leguminosas fixadoras, mas também por uma deficiente absorção de N. Para as outras modalidades não se observaram diferenças significativas nos teores de P residual no solo (Quadro 7).

Quadro 7. Comparação de médias e resultados da Análise de Variância (ANOVA) dos teores de P no solo (mg P kg^{-1}) no solo cultivado com três espécies pratenses (azevém, trevo subterrâneo, serradela rosa) em dois sistemas culturais (monocultura e consociação) e em resposta ao tratamento fosfatado (tratamento: $\text{P0} = 0$; $\text{P1} = 30$; $\text{P2} = 60$; $\text{P3} = 90 \text{ kg P ha}^{-1}$)

Fonte de variação	P extraível (mg P kg^{-1})
Espécie vegetal:	
Azevém (monocultura)	14,37a
Trevo (monocultura)	11,98b
Serradela (monocultura)	10,54b
Consociação	10,59b
Tratamento:	
P0	5,05c
P1	8,47b
P2	13,68a
P3	20,28a
ANOVA	Valores de F
Espécie vegetal	10,99***
Tratamento	149,30***
Interação	3,1**

Na mesma coluna e para o mesmo fator, médias com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Bonferroni; **, *** = valores de F significativos para $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente.

Da observação da Fig. 21, verifica-se que 86% da variação do P extraível no solo é explicada pelo modelo de regressão polinomial, em que por adição de cerca de 90 kg P ha^{-1} se espera um máximo de 24 mg P kg^{-1} no solo ($0,072 \text{ g P vaso}^{-1}$), como é o caso do azevém.

Analisando a percentagem do fertilizante fosfatado que se recuperou na planta e no solo no final do ensaio, de modo a identificar qual dos componentes do sistema (planta completa ou solo) recuperou mais P, ou seja, verificar se após a colheita das plantas existe maior concentração deste elemento no solo ou nas plantas, verificou-se que, em monocultura, e para todas as espécies vegetais, entre 44 e 52% P não foram recuperados no sistema solo - planta, não variando especialmente entre modalidades (Quadro 8). Na consociação, o sistema recuperou, genericamente, um pouco mais P comparativamente com a monocultura, isto é, 48 - 60% P, não tendo sido recuperados 40 - 52% P.

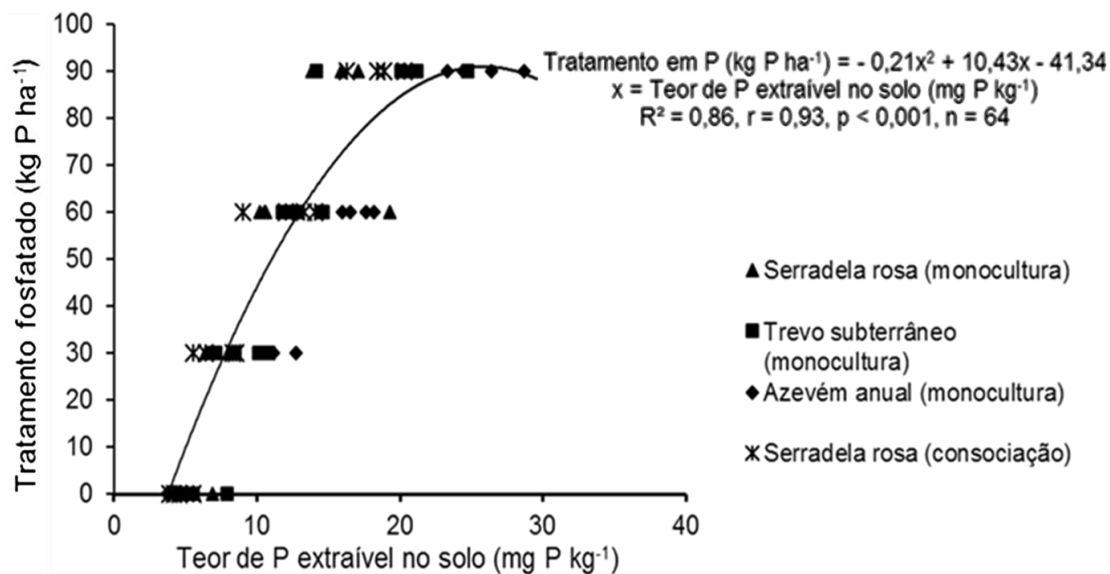


Fig. 21. Relação polinomial entre o tratamento fosfatado (kg P ha^{-1}) e o teor de P extraível no solo (mg P kg^{-1}) ($R^2 = 0,86$, $r = 0,93$, $p < 0,001$, $n = 64$).

Apesar do solo utilizado ter um fraco poder tampão, é importante ter-se em consideração que não houve perdas por lixiviação e/ou escorrência superficial uma vez que o ensaio decorreu em vasos e em ambiente controlado, pelo que é difícil encontrar justificação para o P não recuperado no sistema solo + planta.

Podem-se colocar algumas possíveis explicações para os valores de P não recuperado no solo:

- O teste usado na determinação do P extraível (Égner-Rhiem) pode não ser o mais adequado para este tipo de solo, ligeiramente ácido e com baixo teor de matéria orgânica;
- Algum P adicionado ao solo pode ter sido precipitado pelo Al de troca (os exsudados radiculares fizeram baixar o $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$ do solo para valores da ordem do 5.0, dados não apresentados, deste modo contribuindo para um eventual aumento do Al na solução do solo), precipitando o P adicionado, bem como fixado pelas formas livres de Fe e Al mais ativas;
- Algum P pode ter sido complexado na matéria orgânica do solo, apesar dos baixos teores iniciais (não se verificaram aumentos significativos no teor residual de matéria orgânica no solo; dados não apresentados), tornando-se temporariamente indisponível.

Quadro 8. Quantidade de P recuperado do fertilizante ($P_{\text{fert. recuperado}}$, %) no solo, na planta completa e no sistema (solo + planta) e P não recuperado (%) no sistema (solo + planta) pelas espécies pratenses (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), quando cultivadas em monocultura e consorciadas, sob o efeito do tratamento fosfatado (tratamento: 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹)

Sistema cultural	Espécie pratense	Tratamento fosfatado (kg P ha ⁻¹)	P _{fert. recuperado} (%)			P não recuperado no sistema (%)
			Solo	Planta	Sistema	
Monocultura	Serradela rosa	30	7	42	49	51
		60	21	28	49	51
		90	23	29	52	48
	Trevo subterrâneo	30	21	36	56	44
		60	22	30	52	48
		90	29	21	51	49
	Azevém anual	30	41	14	55	45
		60	40	8	48	52
		90	45	6	51	49
Consorciação	Serradela + Trevo + Azevém	30	16	32	48	52
		60	23	37	60	40
		90	29	24	53	47

Considerando que as plantas foram colhidas no início da floração da serradela (103 DAS) é de esperar que o P do fertilizante recuperado no solo cultivado com as leguminosas (17 - 24%) seja posteriormente utilizado pelas plantas até à fase da maturação completa. As culturas leguminosas continuam a fixar N₂ atmosférico até à maturação, pelo que o P é essencial para a realização do processo de fixação simbiótica completo.

5. CONCLUSÕES

Num ensaio em vasos e em condições ambientais controladas, a dotação de 60 kg P ha⁻¹ (P2) promoveu o aumento da taxa fotossintética nas plantas leguminosas pratenses (trevo subterrâneo e serradela rosa), com o consequente aumento da produção de biomassa aérea, em especial do trevo, aos 103 dias após a sementeira. Aparentemente, esta leguminosa utilizou fisiologicamente o P de modo mais eficiente que a serradela. Para a dotação ótima de P (60 kg P ha⁻¹), cada unidade do elemento adicionado promoveu a produção do dobro da biomassa aérea no trevo, por planta, comparativamente com a serradela. A recuperação do P no sistema solo – planta foi superior (53%) na modalidade trevo em monocultura, seguida da consociação (54%). Por seu lado, a serradela rosa inoculada com estirpes rizobianas de crescimento lento (*Bradyrhizobium* spp.) foi a espécie vegetal mais eficiente na absorção do P adicionado, exibindo uma maior taxa de fixação simbiótica do N₂ por aplicação de 60 kg P ha⁻¹. Esta maior eficiência simbiótica estava relacionada com o maior número de nódulos rizobianos formados, apesar da menor dimensão e peso, e com a maior relação N/P na planta, em especial nos nódulos.

Do exposto pode-se deduzir que, aparentemente, a dose de 60 kg P ha⁻¹ é adequada para pastagens melhoradas, permanentes, instaladas em solos pobres e ligeiramente ácidos de zonas Mediterrânicas.

A serradela rosa parece mais adequada como cultura forrageira devido ao seu elevado porte ereto, a menos que o pastoreio seja devidamente controlado de modo a permitir uma boa exposição solar das culturas associadas, designadamente o trevo subterrâneo.

Este estudo deverá ter continuação, versando outras misturas de sementes pratenses, e realizado em diferentes condições de campo, para se poder concluir, com maior segurança, sobre a veracidade do padrão de resultados aqui encontrados.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, C.; Rodrigues, F. M.; Simões, N.; Barradas, A.; Carita, T.; Alarcão, C. & Crespo, D. (2013). Prados, Pastagens e Forragens. Trevo subterrâneo. In: *AGROTEC* (ed.). (8): 44-45. Disponível em <http://hdl.handle.net/10316.2/33584>, data de consulta a 16-09-2015.
- Al-Niemi, T.S.; Kahn, M.L. & McDermott, T.R. (1997). P metabolismo in the bean *Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiology*, 113: 1233-1242.
- Anzanello, R.; Souza, P.V.D. & Casamali, B. (2011). Fungos micorrízicos arbuscular (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. *Bragantia* 70 (2): 409-415.
- Aquilar, S.A. & van Diest, A. (1981). Rock-phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 61: 27-42.
- Balbino, L.M. (1968). O método de Egnér-Riehm a determinação do fósforo e do potássio assimiláveis em solos de Portugal. *Revista Agronómica* 51: 47-56.
- Barbosa, F.E.L.; Ferreira, F.J.; Filho, F.L.A.; Farias, G.C.; Feitosa, H.O. & Lacerda, C.F. (2012). *Teor de clorofila em plantas de bananeira consorciado com leguminosas sob diferentes lâminas de irrigação*. Workshop internacional de Inovações Tecnológicas na Irrigação. Fortaleza, Brasil. Disponível em <http://www.inovagri.org.br/meeting2012/wp-content/uploads/2012/06/Protocolo497.pdf>, data da consulta a 09-03-2016.
- Berbara, R.L.L.; Souza, F.A. & Fonseca, H.M.A.C. (2006). Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. *Nutrição Mineral de Plantas*, 432: 54-79.
- Bolland, M.D.A. & Paynter, B.H. (1992). Comparative responses of annual pasture legume species to superphosphate applications in medium and high rainfall areas of Western Australia. *Fertilizer Research*, 31: 21-33.
- Bonfim-Silva, E. M.; Anicésio, E. C. A.; Silva, F. C. M.; Dourado, L. G. A.; Agüero, N. F. (2011). Compactação do solo na cultura do trigo em Latossolo do cerrado. *Enciclopédia Biosfera*, 7: 1-6.
- Boucho, A.C.M.; Ribeiro, S.H., Pereira, C.; Carranca, C.; Madeira, M.V.; Redondo, R.; Smedo, J. & Calouro, F. (2016). Qual a importância do fósforo nas pastagens biodiversas? *Vida Rural*, Maio: 40-41.
- Carranca, C. (2000). *Principais processos do ciclo do azoto numa agricultura sustentável. Avaliação através do marcador ¹⁵N*. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Oeiras, 118 pp.
- Carranca, C. (2013). Legumes: Properties and symbiosis. In: Camisão, A.H., Pedroso, C.C. (Eds) *Symbiosis: Evolution, Biology and Ecological Effects*, pp.67-94. Animal Science, Issues and Professions. Nova Science Publishers, New York.
- Carranca, C.; de Varennes, A. & Rolston, D. (1999). Biological nitrogen fixation estimated by ¹⁵N dilution, natural ¹⁵N abundance, and N difference techniques in a subterranean clover-grass sward under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*, 10: 81-89.
- Carranca, C; Torres, M.O. & Madeira, M. (2015). Underestimated role of legume roots for soil N fertility. *Agronomy for Sustainable Development*, 35:1095-1102.

- Carvalho, A.E. (2002). *Avaliação agrônômica da disponibilização de nitrogênio à cultura de feijão sob sistema de semeadura direta*. Dissertação em Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Brasil.
- Chalk, P.M.; Alves, B.J.R. & Boddey, R.M. (2010). Integrated effects of abiotic stresses on inoculant performance, legume growth and symbiotic dependance estimated by ^{15}N dilution. *Plant Soil*, 328: 1-16.
- Cordell, D.; Drangert, J.O. & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19: 292-305.
- Crusciol, C.A.C.; Mauad, M.; Alvarez, R.C.F.; Lima, E.V. & Tiritan, C.S. (2005). Doses de fósforo e crescimento radicular de cultivares de arroz de terras altas. *Bragantia*, 64 (4): 643-649.
- Davies, J.H.C. 1997. Phaseolus beans. In: H.C. Wien (ed.), *The Physiology of Vegetable Crops*: 409-428. CABI International, Wallingford, Oxon, UK.
- De Varennes, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora: 474 pp.
- De Varennes; A. & Goss, M.J. (2007). The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 2603-2607.
- Del Pozo, A. & Ovalle, C. (2009). Productivity and persistence of yellow serradela (*Ornithopus compressus* L.) and biserrula (*Biserrula pelecinus* L.) in the mediterranean climate region of central Chile. *Chilean Journal Agricultural Research*, 69 (3): 340-349.
- Derylo, M.; Bednara, J.; Glowacka, M. & Skorupska, A. (1995). Symbiotic properties of *Bradyrhizobium* spp. (*Lupinus*) assayed on serradela plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64 (4): 359-365.
- Dodd, M.B. & Orr, S.J. (1995). Seasonal growth, flowering patterns, and phosphate response of 18 annual legume species grown in a Hill-country soil. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38: 32.
- Duarte, M.L.; Pacheco, C. & Soveral-Dias, J.C. (1979). Métodos de análise foliar. CNEFF. 108 pp.
- Epstein, E. & Bloom, A.J. (2006). *Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas*. 2.ed. Londrina, Planta: 401pp.
- Fagan, E.B.; Medeiros, S.L.P., Manfron, P.A., Casaroli, D.; Simon, J.; Neto, D.D.; Van Lier, Q.J.; Santos, O.S. & Müller, L. (2007). Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio na soja. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguiana*, 14 (1): 89-106.
- Farinha, N.; Sousa, T. & Romano, A.M. (1998). Perspetivas de eleição das primeiras cultivares portuguesas de trevo subterrâneo. *Pastagens e Forragens*, 19:137-144.
- Fernandes, A. & Reis, A. (2001). Serradela, *Ornithopus sativus* (96). Direção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho. Disponível em http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/FICHAS_DRAEDM/Ficha_tecnica_096_2001.pdf, data de consulta a 28-09-2015.
- Fernandes, J.R.C. & Rodrigues, P. (2014). Importância da inoculação com bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* na produção de leguminosas e o uso do azoto. Disponível em <http://www.agronegocios.eu/noticias/importancia-da->

inoculacao-com-bacterias-rhizobium-e-bradyrhizobium-na-producao-de-leguminosas-e-o-uso-do-azoto/, data da consulta a 28-09-2015.

- Figueiredo, N.M.R. (2011). *Dinâmica do azoto em campos alagados para produção de arroz, em Salvaterra de Magos*. Dissertação de mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Figueiredo, M.V.B.; Junior, M.A.L.; Araújo, A.S.F. & Martinez, C.R. (2008). *Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N₂*. Disponível em <http://www.bashanfoundation.org/marcia/marciafactores.pdf>, data da consulta a 07-01-2016.
- Fixen, P.E. (2009). Reservas Mundiais de nutrientes dos fertilizantes. *Informações Agronómicas*, 126: 8-14.
- Fontaneli, R.S.; Santos, H.P. & Fontaneli, R.S. (2012). Forrageiras para Integração Lavoura-Pecuária-Floresta na Região Sul-Brasileira. *Embrapa*, Brasília. 340 pp.
- Freixial, R.M.L. & Barros, J.F.L. (2012). Pastagens. *Texto de apoio para as unidades curriculares de Sistemas e Tecnologias Agropecuários. Noções Básicas de Agricultura e Tecnologia do Solo e das Culturas*. Universidade de Évora. 28 pp.
- Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral – GPP. (2015). Dinâmicas da utilização do solo pela agricultura. *Cultivar- Cadernos de Análise e Prospetiva* 2: 63-75.
- Gomes, M.P. & Silva, A.A. (1962). Um novo diagrama triangular para a classificação básica da textura do solo. *Garcia de Orta*, 10: 171-179.
- Gómez-Rey, M.X.; Garcês, A. & Madeira, M. (2012) Soil organic C accumulation and N availability determined by improved pastures in oak woodlands in Southern Portugal. *Soil Use and Management*, 28(4): 497-507
- Gonçalves, F.M.V.T.T. (2015). *Estudo comparativo de leguminosas pratenses anuais*. Dissertação de mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Gonzaga, S.S. (2002). Inoculação de sementes de leguminosas. Instrução Técnica para o Produtor. *Embrapa, Pecuária Sul* 14. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55867/1/IT-14-2002.pdf>, data da consulta a 12-11-2015.
- Graham, P.H. & Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65: 93-106.
- Grant, C.A.; Flaten, D.N.; Tomasiewieck, D.J. & Sheppard, S.C. (2001). A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agronómicas*, 95: 1-5.
- Guo, Y.; Li, G.D.; Hayes, R.C.; Dear, B.S. & Price, A. (2016). Tolerance of the annual legumes *Biserrula pelecinus*, *Ornithopus sativa*, *Trifolium spumosum*, *T. vesiculosum* and *T. subterraneum* to soil acidity. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 55: 1-14.
- Haque, I.; Nhadi, L.A. & Mohamed-Saleem, M.A. (1985). Phosphorus management with spatial reference to forage legumes in sub-Saharan Africa. In: Haque, I.; Jutzi, S. Neate, P.J.H. (Eds). *Potentials of forage legumes in farming systems of sub-Saharan Africa. Proceedings of a Workshop Held at International Livestock Center for Africa Addis Abeba, Ethiopia*.

- Hart, A.L. (1988). The physiology of phosphorus and its relevance to phosphorus efficiency in white clover. *Proceeding of the Agronomy Society*, 2 (18): 37-40.
- Hart, A.L. (1989). Nodule phosphorus and nodule activity in white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 32: 145-149.
- Horta, M. C. & Torrent, J. (2007). Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of Portuguese acid soils. *Soil Science*, 172 (8): 631-638.
- Horta, M. C. & Torrent, J. (2010). *Dinâmica do fósforo no solo. Perspectiva agronómica e ambiental*. Instituto Politécnico de Castelo Branco. 98 pp.
- Horta, C.; Roboredo, M. & Torrent, J. (2015). Aplicação de resíduos orgânicos de pecuária ao solo: Dessorção potencial de fosfato para as águas (Animal manures applied to soil: potential of phosphate release to water). *O solo na Investigação Científica em Portugal*: 77-79.
- Howieson, J. & Ballard, R. (2004). Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within Southern Australia-some contemporary thoughts. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1261-1273.
- Hungria, M.; Campo, R.J. & Mendes, I.C. (2001). Fixação biológica do nitrogénio na cultura da soja. Embrapa Soja. *Circular Técnica*, 35. 48 pp.
- Iglesias, I. & Lloveras, J. (2000). Forage production and quality of serradela in mild winter areas in north-west Spain. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 43: 35-40.
- Jordan, P.R. (2011). *Response of 12 pasture legumes to phosphorus and lime additions when grown in a high country soil under glasshouse conditions*. Dissertação de mestrado em Lincoln University, New Zealand.
- Junior, M.A.L.; Ferreira, R.L.V.; Cunha, K.P.V. & Figueiredo, M.V.B. (2010). Análise de imagens para acompanhamento da nodulação em leguminosas. Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Instituto Agronômico de Pernambuco. *Embrapa, Informação Tecnológica*: 479-503.
- Krolow, R.H.; Mistura, C.; Coelho, R.W.; Siewerdt, L. & Zonta, E.P. (2004). Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33 (6): 2224-2300.
- Krussel, L.; Madsen, L.H.; Sato, S.; Aubert, G.; Genua, A.; Szczyglowski, K.; Duc, G.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Bruijn, F.; Pajuelo, E.; Sandal, N. & Stougaard, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420: 422-426.
- Lindström, K.; Murwira, M.; Willems, A. & Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, 161: 453-463.
- Long, A. (1974). Manual of chemical methods of plant analysis – Plant nutrition section. LARS, University of Bristol, UK.
- Lopes, V.; Nogueira, A. & Fernandes, A. (2006). Cultura de azevém anual (53). Direção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho. Disponível em http://www.drapn.min-agricultura.pt/drapn/conteudos/FICHAS_DRAEDM/Ficha_tecnica_053_2006.pdf, data de consulta a 28-09-2015.

- LQARS (Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva). (2000). *Manual de fertilização das culturas*. INIA, MADRP, Lisboa.
- Madeira, A.C.; Madeira, M.V.; Fabião, A.; Marques, P. & Carneiro, M. (2009). Avaliação da nutrição de plantações jovens de eucalipto por análise foliar e métodos não destrutivos. *Revista de Ciências Agrárias*, 32 (2): 139-153.
- Martins A.; Marques G.; Borges O.; Portela E.; Lousada J.; Raimundo F. & Madeira, M. 2010. Management of chestnut plantations for a multifunctional land use under Mediterranean conditions: effects on productivity and sustainability. *Agroforestry Systems*, 81 (2): 175-189.
- Mengel, K. & Kirkby, E.A. (2001). *Principles of plant nutrition*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 849 pp.
- Metson, A.J. (1961). Methods of chemical analysis for survey samples. *Soil bureau bulletin*. 12, New Zealand. 208 pp.
- Moreira, N. (2002). *Agronomia das forragens e pastagens*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 183 pp.
- Neto, C.S.B. (2007). *Estudo da dinâmica do azoto em pereira (Pyrus communis L.)*. Dissertação de doutoramento em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Neves, O.S.C.; Carvalho, J.G. & Dia, F.A. (2005). Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 40 (5): 517-521.
- Othman, W.M.W.; Lie, T.A.; Mannelje, L.T. & Wassink, G.Y. (1991). Low level phosphorus supply affecting nodulation, N₂ fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant and Soil*, 135: 67-74.
- Ovalle, C.; Arredondo, S. & Romero, O. (2006). Yellow serradela (*Ornithopus compressus*) and pink serradela (*O.sativus*): two new species of annual legumes for the Mediterranean climate zone of Chile. *Agricultura Técnica*, 66 (2): 196-209.
- Perdigão, M.A.H. (2011). Potencialidade de leguminosas forrageiras anuais como fonte de azoto em agricultura biológica. *Revista de Ciências Agrárias*, 34 (2): 141-153.
- Pérez, F.M.A.; Clavo, M.E.; Ramírez, R.; Moreno, G.L. & Valentine, A. (2016). Patterns of growth costs and nitrogen acquisition in *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. and *Cystisus balansae* (Boiss.) Ball are mediated by sources of inorganic N. *Plants*, 5: 1-5.
- Pestana, M.; Correia, P.J.; Varennes, A.; Abadia, J. & Faria, E.A. (2001) - Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 613-622.
- Raimundo F.; Coutinho J.; Martins A. & Madeira, M. (2015). Soil management system effects on N availability and tree N status in chestnut plantations under Mediterranean conditions. *Revista de Ciências Agrárias*, 38 (4): 547-562.
- Ramos, S.J.; Faqui, V.; Rodrigues, C.R. & Silva, C.A. (2010). Efeito residual das aplicações de fontes de fósforo em gramíneas forrageiras sobre o cultivo sucessivo da soja em vasos. *Bragantia*, 69 (1): 149-155.
- Regulamento (CE) n.º 796/2004. Jornal Oficial da União Europeia, 141: 18-59.

- Riehm, H. (1958). Die ammoniumlaktatessigsäure – Methode zur Bestimmung der Leichtlöslichen Phosphorsäure in Karbonathaltigen Böden. *Agrochimica*, 3: 49-65.
- Rodrigues A. R.; Silva E.; Santos G.; Coutinho J. & Madeira, M. (2015). Soil C and N dynamics and enzymatic activity in *montados*: improved pastures effect. *Revista de Ciências Agrárias*, 38 (4): 535-546
- Sfredo, G.J. & Borkert, C.M. (2004). Deficiências e toxicidades de nutrientes em plantas de soja - Descrição dos sintomas e ilustração com fotos. *Embrapa Soja*, 231: 9-44.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F. & Moreira, F. W. (1994). Capacidade de nodulação de cem leguminosas na Amazônia. *Ata Amazônica*, 24: 9-18
- Sulieman, S; Fischinger, S. & Shulze, J. (2008). N-feedback regulation of N₂ fixation in *Medicago truncatula* under P-deficiency. *Plant Physiology Special*, 34, 33-54.
- Tavares, R.C.C. (2014). *Pastagens de altitude- caracterização de uma exploração na região da Guarda*. Dissertação de mestrado em Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Teixeira, R.F.M.; Domingos, T.; Costa, A.P.S.V.; Oliveira, R.; Farropas, L.; Calouro, F.; Barradas, A.M. & Carneiro, J.P.B.G. (2011). Soil organic matter dynamics in Portuguese natural and sow rainfed grasslands. *Ecological Modelling*, 222: 993-1001.
- Volaire, F.; Leliere, F. & Prosperi, J.M. (1992). Production of cultivars and native populations of *Trifolium subterraneum* L. In the south of France (Corsica). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 32 (5): 619-625.
- Weisany, W.; Raei, Y. & Allahverdipoor, K.H. (2013). Role of some of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 2 (4):77-84.
- World Reference Base for Soil Resources. (2006) *World Soil Resources Reports* 103, FAO, Rome.
- Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 968-989
- Zotarelli, L.; Cardoso, E.G.; Piccin, J.L.; Urguiaga, S.; Boddey, R.M. & Alves, B.J.R. (2003). Calibração do medidor de clorofila Minolta-SPAD-502 para avaliação do conteúdo de nitrogênio no milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38 (9): 1117-1222.

ANEXOS

Índice de anexos

Quadro Anexo 1: Medições SPAD na primeira e segunda datas (7/12/2015 e 12/01/2016), para cada espécie pratense (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), nos dois sistemas culturais (M = monocultura, C = consociação), sob o efeito do tratamento fosfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹) ... 64

Quadro Anexo 2: Número de plantas (Nº), biomassa produzida (g PS planta⁻¹), P e N totais (g kg⁻¹ PS), Nda (%) e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)), para cada espécie pratense (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), em ambos os sistemas culturais (M = monocultura; C = consociação), para cada órgão da planta (A = parte aérea; R = raiz, sem nódulos no caso das leguminosas) e o tratamento osfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹) 67

Quadro Anexo 3: Regressões polinomiais não significativas para a serradela rosa, em consociação e para o azevém anual, em monocultura..... 73

Figura Anexo 3. Regressão polinomial entre os valores da biomassa aérea (g PS planta⁻¹) e o tratamento em P (kg P ha⁻¹) para o azevém anual em consociação a) e para o conjunto das três espécies b) em ambos os sistemas culturais.....72

Quadro Anexo 4: Número dos nódulos rizobianos (Nº), biomassa (mg PS planta⁻¹), P e N totais (g kg⁻¹ PS), Nda (%) e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nos nódulos rizobianos (nº) das leguminosas (serradela rosa e trevo subterrâneo) em ambos os sistemas culturais (M= monocultura, C = consociação) para o efeito do tratamento fosfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60, 90 kg P ha⁻¹) 74

Quadro Anexo 5. Teores de P extraível no solo (P ext) e P exportado (P exp) na biomassa radicular (BR), aérea (BA) e nódulos (N), para as espécies pratenses (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual) em monocultura (M) e consociadas (C), e para o efeito do tratamento fosfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹) 76

ANEXO 1

Quadro Anexo 1: Medições SPAD na primeira e segunda datas (7/12/2015 e 12/01/2016), para cada espécie pratense (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), nos dois sistemas culturais (M = monocultura, C = consociação), sob o efeito do tratamento fosfatado (trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹)

Sistema cultural	Espécie pratense	Trat. fosfatado (kg P ha ⁻¹)	SPAD (1ªData)	SPAD (2ªData)
M	Serradela	0	18,6	10,9
M	Serradela	0	25,7	9,1
M	Serradela	0	20,3	13
M	Serradela	0	18,9	19,7
M	Serradela	30	20,1	19,3
M	Serradela	30	20,9	20,4
M	Serradela	30	20	26,2
M	Serradela	30	19,2	15
M	Serradela	60	17,1	19,6
M	Serradela	60	20,9	14,5
M	Serradela	60	22,4	23,9
M	Serradela	60	21,1	21,4
M	Serradela	90	17,5	20,2
M	Serradela	90	25,1	24
M	Serradela	90	19,5	12,3
M	Serradela	90	24,4	28,7
M	Trevo	0	40,1	33,9
M	Trevo	0	30,5	35,8
M	Trevo	0	35,9	30,8
M	Trevo	0	44,6	40,4
M	Trevo	30	46,7	44,2
M	Trevo	30	50,5	39,6
M	Trevo	30	44,8	34,9
M	Trevo	30	38,2	45,2
M	Trevo	60	47	44,5
M	Trevo	60	44,5	40,7
M	Trevo	60	43	48,3

Quadro Anexo 1 (Continuação):

M	Trevo	60	46,3	43,3
M	Trevo	90	50,3	38,8
M	Trevo	90	42,9	40,1
M	Trevo	90	50,3	38,4
M	Trevo	90	47,1	37,5
M	Azevém	0	18,6	12,1
M	Azevém	0	25,7	13,8
M	Azevém	0	20,3	15,1
M	Azevém	0	18,9	13,4
M	Azevém	30	20,1	16,1
M	Azevém	30	20,9	12,5
M	Azevém	30	20	12,1
M	Azevém	30	19,2	18,2
M	Azevém	60	17,1	13,3
M	Azevém	60	20,9	14,9
M	Azevém	60	22,4	10,8
M	Azevém	60	21,1	12,1
M	Azevém	90	17,5	12,2
M	Azevém	90	25,1	13,2
M	Azevém	90	19,5	15,9
M	Azevém	90	24,4	14,2
C	Serradela	0	27,2	14,6
C	Serradela	0	29	9,6
C	Serradela	0	28,9	10,1
C	Serradela	0	27,4	20
C	Serradela	30	28,6	21
C	Serradela	30	38,6	28,3
C	Serradela	30	36	29,6
C	Serradela	30	37,6	29
C	Serradela	60	39,7	21,9
C	Serradela	60	36,3	26,3
C	Serradela	60	30,4	17,9

Quadro Anexo 1 (Continuação):

C	Serradela	60	37,4	28,1
C	Serradela	90	35,3	15
C	Serradela	90	36	24,8
C	Serradela	90	37,9	16,4
C	Serradela	90	35,7	26,9
C	Azevém	0	23,1	19,2
C	Azevém	0	22,7	15,6
C	Azevém	0	16,2	6,3
C	Azevém	0	24,1	15,4
C	Azevém	30	20,3	10,9
C	Azevém	30	27,8	16,8
C	Azevém	30	24,6	18,1
C	Azevém	30	22,4	14,2
C	Azevém	60	23,9	13,9
C	Azevém	60	25,7	16,9
C	Azevém	60	21,7	17,5
C	Azevém	60	26,8	19,3
C	Azevém	90	20,8	5,8
C	Azevém	90	23,3	16,5
C	Azevém	90	25,4	11,8
C	Azevém	90	21,4	14,5

ANEXO 2

Quadro Anexo 2: Número de plantas (N^0), biomassa produzida (g PS planta^{-1}), P e N totais (g kg^{-1} PS), Nda (%) e N_2 fixado (mg N planta^{-1} (PS)), para cada espécie pratense (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual), em ambos os sistemas culturais (M = monocultura; C = consociação), para cada órgão da planta (A = parte aérea; R = raiz, sem nódulos no caso das leguminosas) e o tratamento fosfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha^{-1})

Sistema cultural	Espécie pratense	Trat fosf.	N^0	Órgão planta	Biomassa	P total	N total	Nda	N_2 fixado
					(g PS planta^{-1})	-----(g kg^{-1} PS)-----		(%)	(mg N planta^{-1} (PS))
M	Serradela	0	9	A	0,174	0,77	22,7	69,9	3,0
M	Serradela	0	6	A	0,873	0,84	24	73,0	15,0
M	Serradela	0	9	A	0,784	0,82	20,8	85,1	14,0
M	Serradela	0	6	A	0,930	0,88	23,4	79,1	17,0
M	Serradela	0	9	R	0,049	1,5	25,5	50,8	1,0
M	Serradela	0	6	R	0,192	1,5	28,6	52,5	3,0
M	Serradela	0	9	R	0,168	1,5	23,6	63,1	2,0
M	Serradela	0	6	R	0,278	1,5	25,1	61,0	4,0
M	Serradela	30	8	A	1,125	1,6	26,4	93,3	28,0
M	Serradela	30	11	A	1,050	1,7	28,9	89,0	27,0
M	Serradela	30	5	A	2,428	1,8	31,3	90,2	69,0
M	Serradela	30	8	A	1,416	2,1	30,1	92,9	40,0
M	Serradela	30	8	R	0,278	1,9	31,2	80,5	7,0
M	Serradela	30	11	R	0,296	1,8	24,1	76,1	5,0
M	Serradela	30	5	R	0,408	1,8	27,5	79,2	9,0
M	Serradela	30	8	R	0,406	2,1	23,7	82,2	8,0
M	Serradela	60	3	A	1,233	1,6	28,9	92,5	33,0
M	Serradela	60	9	A	1,339	2,9	33,1	94,5	42,0
M	Serradela	60	10	A	1,156	2,4	32	93,8	35,0
M	Serradela	60	7	A	1,853	2,8	31,9	89,1	53,0
M	Serradela	60	3	R	0,233	2,7	26,9	85,3	5,0
M	Serradela	60	9	R	0,199	2,4	25,6	84,0	4,0
M	Serradela	60	10	R	0,239	2,9	33,2	85,4	7,0
M	Serradela	60	7	R	0,354	2,7	32,7	74,0	9,0
M	Serradela	90	11	A	1,143	3,1	28,5	92,5	30,0
M	Serradela	90	6	A	2,130	3,4	32,6	91,3	63,0
M	Serradela	90	11	A	1,111	3,1	30,8	92,3	32,0
M	Serradela	90	8	A	1,536	3,8	35,8	94,4	52,0
M	Serradela	90	6	R	0,375	3,1	34,7	80,2	10,0
M	Serradela	90	11	R	0,187	3,1	34,3	81,8	5,0

Quadro Anexo 2 (Continuação):

M	Serradela	90	11	R	0,186	2,7	28,9	78,1	4,0
M	Serradela	90	8	R	0,213	2,9	29	72,9	4,0
M	Trevo	0	3	A	0,797	1,5	28,6	69,9	16,0
M	Trevo	0	3	A	0,510	1,9	27,9	75,4	11,0
M	Trevo	0	3	A	0,947	1,3	25,8	80,0	20,0
M	Trevo	0	2	A	1,405	1,6	27,2	99,3	38,0
M	Trevo	0	3	R	0,380	1,7	29,2	55,3	6,0
M	Trevo	0	3	R	0,203	1,7	25,7	30,5	2,0
M	Trevo	0	3	R	0,380	1,7	27,8	69,8	7,0
M	Trevo	0	2	R	0,570	1,7	26,3	98,1	15,0
M	Trevo	30	3	A	4,850	1,8	29,2	89,6	127,0
M	Trevo	30	3	A	1,917	2,6	25,9	77,7	39,0
M	Trevo	30	3	A	1,550	2,7	33,3	76,8	40,0
M	Trevo	30	3	A	2,413	1,7	27,6	85,9	57,0
M	Trevo	30	3	R	0,820	1,9	29,2	70,6	17,0
M	Trevo	30	3	R	0,503	2	24,5	42,7	5,0
M	Trevo	30	3	R	0,433	2,1	27,4	49,1	6,0
M	Trevo	30	3	R	0,783	2,2	26,9	69,8	15,0
M	Trevo	60	2	A	4,725	3,3	31,9	92,1	139,0
M	Trevo	60	3	A	3,220	2,9	36,1	90,0	105,0
M	Trevo	60	2	A	4,410	3	29,9	88,2	116,0
M	Trevo	60	2	A	3,300	3,3	35,4	83,6	98,0
M	Trevo	60	2	R	0,925	3,4	30,1	86,5	24,0
M	Trevo	60	3	R	0,633	3,4	32,2	72,9	15,0
M	Trevo	60	2	R	1,015	3,4	26,4	66,8	18,0
M	Trevo	60	2	R	0,755	3,4	28,3	53,7	11,0
M	Trevo	90	2	A	4,040	3,9	31	90,9	114,0
M	Trevo	90	3	A	2,370	3,7	32,2	83,0	63,0
M	Trevo	90	2	A	5,395	3,5	36,5	88,2	174,0
M	Trevo	90	2	A	2,510	4	32,2	83,0	67,0
M	Trevo	90	2	R	0,820	3,5	24,2	62,9	12,0
M	Trevo	90	3	R	0,550	3,5	29	50,3	8,0
M	Trevo	90	2	R	0,760	3,5	30	64,8	15,0
M	Trevo	90	2	R	0,645	3,5	26,9	30,2	5,0
M	Azevém	0	19	A	0,188	0,85	6,7	-	-
M	Azevém	0	14	A	0,294	0,84	7,5	-	-
M	Azevém	0	13	A	0,265	0,77	6,6	-	-
M	Azevém	0	19	A	0,183	0,96	7,7	-	-

Quadro Anexo 2 (Continuação):

M	Azevém	0	19	R	0,202	0,67	5,9	-	-
M	Azevém	0	14	R	0,384	0,51	5,7	-	-
M	Azevém	0	13	R	0,263	0,67	5,2	-	-
M	Azevém	0	19	R	0,101	0,72	6,6	-	-
M	Azevém	30	19	A	0,199	1,7	5,3	-	-
M	Azevém	30	12	A	0,310	1,7	7,4	-	-
M	Azevém	30	10	A	0,467	1,5	6,7	-	-
M	Azevém	30	16	A	0,250	1,9	6	-	-
M	Azevém	30	19	R	0,287	0,64	7,2	-	-
M	Azevém	30	12	R	0,287	3,4	7	-	-
M	Azevém	30	10	R	0,278	1	6,1	-	-
M	Azevém	30	16	R	0,118	0,73	6,1	-	-
M	Azevém	60	23	A	0,122	2,3	6	-	-
M	Azevém	60	20	A	0,168	2,3	6	-	-
M	Azevém	60	14	A	0,270	1,8	6,6	-	-
M	Azevém	60	14	A	0,301	2	6,6	-	-
M	Azevém	60	23	R	0,175	1,3	6,5	-	-
M	Azevém	60	20	R	0,142	1,3	7,6	-	-
M	Azevém	60	14	R	0,141	1,1	5,9	-	-
M	Azevém	60	14	R	0,160	0,98	4,7	-	-
M	Azevém	90	20	A	0,201	2	6	-	-
M	Azevém	90	12	A	0,291	2,4	6,6	-	-
M	Azevém	90	20	A	0,214	2	6	-	-
M	Azevém	90	14	A	0,281	2,2	5,8	-	-
M	Azevém	90	20	R	0,412	0,92	6,4	-	-
M	Azevém	90	12	R	0,145	0,86	7,2	-	-
M	Azevém	90	20	R	0,252	0,74	6,6	-	-
M	Azevém	90	14	R	0,125	0,92	8,9	-	-
C	Serradela	0	6	A	0,875	0,78	21,6	80,1	15,0
C	Serradela	0	4	A	0,443	0,77	20	94,4	19,0
C	Serradela	0	4	A	3,138	0,82	17,8	56,0	31,0
C	Serradela	0	5	A	1,128	0,73	14,2	58,3	9,0
C	Serradela	0	6	R	0,288	0,45	14,9	44,8	2,0
C	Serradela	0	4	R	0,173	0,45	15	37,0	2,0
C	Serradela	0	4	R	0,160	0,45	20,1	26,8	1,0
C	Serradela	0	5	R	0,810	0,45	17,7	59,5	9,0
C	Serradela	30	5	A	0,000	2,5	36,7	98,4	8,0
C	Serradela	30	6	A	0,928	1,8	32,5	96,9	29,0

Quadro Anexo 2 (Continuação):

C	Serradela	30	2	A	1,030	3,1	25,8	95,1	25,0
C	Serradela	30	5	R	0,272	1,2	17,7	63,2	4,0
C	Serradela	30	3	R	1,317	0,61	17,6	13,6	3,0
C	Serradela	30	6	R	0,197	1,6	28,3	50,7	3,0
C	Serradela	30	2	R	1,165	1,4	16,8	39,5	8,0
C	Serradela	60	1	A	1,190	3	38,6	97,3	103,0
C	Serradela	60	1	A	3,920	3	29,4	96,0	116,0
C	Serradela	60	5	A	1,806	3	29,9	97,7	53,0
C	Serradela	60	5	A	4,276	3	36,1	96,4	155,0
C	Serradela	60	1	R	2,630	1,8	9,1	39,3	9,0
C	Serradela	60	1	R	2,390	1,8	10,3	41,3	10,0
C	Serradela	60	5	R	0,688	1,8	14,3	40,5	4,0
C	Serradela	60	5	R	0,322	1,8	21,6	44,0	3,0
C	Serradela	90	5	A	1,032	3,5	30,5	80,7	28,0
C	Serradela	90	5	A	1,426	2,8	31,7	97,3	44,0
C	Serradela	90	5	A	2,570	3,6	33,8	96,7	26,0
C	Serradela	90	6	A	0,898	4,3	31,6	96,0	27,0
C	Serradela	90	5	R	0,768	2,2	10,4	62,1	5,0
C	Serradela	90	5	R	0,522	2,1	21,6	75,6	9,0
C	Serradela	90	5	R	0,632	2,1	16,4	57,0	6,0
C	Serradela	90	6	R	0,428	2,2	17,1	53,7	4,0
C	Trevo	0	1	A	0,010	-	-	-	-
C	Trevo	0	1	A	0,590	-	-	-	-
C	Trevo	0	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	0	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	0	1	R	0,005	-	-	-	-
C	Trevo	0	1	R	0,135	-	-	-	-
C	Trevo	0	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	0	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	1	A	0,220	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	1	R	0,045	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	30	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	60	2	A	1,550	-	-	-	-

Quadro Anexo 2 (Continuação):

C	Trevo	60	2	A	0,180	-	-	-	-
C	Trevo	60	1	A	0,010	-	-	-	-
C	Trevo	60	1	A	0,180	-	-	-	-
C	Trevo	60	2	R	0,085	-	-	-	-
C	Trevo	60	2	R	0,040	-	-	-	-
C	Trevo	60	1	R	0,020	-	-	-	-
C	Trevo	60	1	R	0,090	-	-	-	-
C	Trevo	90	1	A	0,100	-	-	-	-
C	Trevo	90	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	90	1	A	0,020	-	-	-	-
C	Trevo	90	-	A	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	90	1	R	0,035	-	-	-	-
C	Trevo	90	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Trevo	90	1	R	0,005	-	-	-	-
C	Trevo	90	-	R	0,001	-	-	-	-
C	Azevém	0	4	A	0,368	0,56	6	-	-
C	Azevém	0	7	A	0,200	0,56	9	-	-
C	Azevém	0	3	A	0,033	0,56	20,9	-	-
C	Azevém	0	8	A	0,360	0,56	6	-	-
C	Azevém	0	4	R	0,580	0,85	9,2	-	-
C	Azevém	0	7	R	0,341	0,85	5,5	-	-
C	Azevém	0	3	R	0,193	0,85	20,7	-	-
C	Azevém	0	8	R	0,275	0,85	10,8	-	-
C	Azevém	30	5	A	0,448	1,9	7,9	-	-
C	Azevém	30	7	A	0,667	1,2	6,6	-	-
C	Azevém	30	6	A	0,455	1,1	6,3	-	-
C	Azevém	30	12	A	0,269	1,6	7,9	-	-
C	Azevém	30	5	R	0,378	1,3	9,6	-	-
C	Azevém	30	7	R	0,690	0,99	10,6	-	-
C	Azevém	30	6	R	1,573	0,7	9,8	-	-
C	Azevém	30	12	R	0,551	0,97	7,8	-	-
C	Azevém	60	6	A	0,747	2	5,9	-	-
C	Azevém	60	6	A	0,593	2	7,3	-	-
C	Azevém	60	5	A	0,306	2	9,3	-	-
C	Azevém	60	3	A	0,967	2	4,2	-	-
C	Azevém	60	6	R	0,323	1,3	8,1	-	-
C	Azevém	60	6	R	0,488	1,6	8,7	-	-
C	Azevém	60	5	R	0,504	1,1	11,4	-	-

Quadro Anexo 2 (Continuação):

C	Azevém	60	3	R	1,593	1,3	13,5	-	-
C	Azevém	90	5	A	0,614	2,1	6,6	-	-
C	Azevém	90	2	A	1,125	2,4	5,4	-	-
C	Azevém	90	9	A	0,434	2	8,1	-	-
C	Azevém	90	5	A	0,674	1,7	6,4	-	-
C	Azevém	90	5	R	0,354	1	8,5	-	-
C	Azevém	90	2	R	1,770	1,2	8,2	-	-
C	Azevém	90	9	R	0,297	1,4	6	-	-
C	Azevém	90	5	R	0,460	1,2	10,4	-	-

- = valores não determinados.

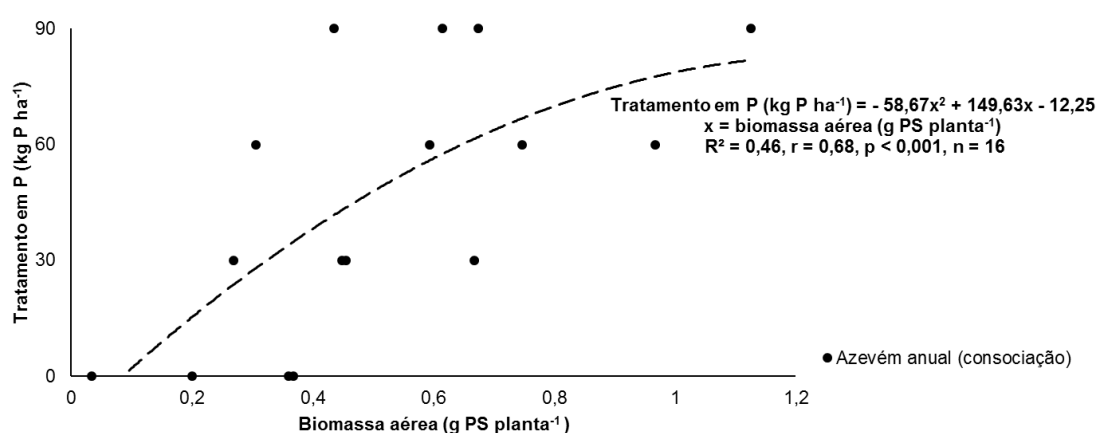
ANEXO 3

Quadro Anexo 3: Regressões polinomiais não significativas para a serradela rosa, em consociação e para o azevém anual, em monocultura

Espécie e sistema cultural	Modelos	R ²	p	n
Serradela rosa (consociação)	Tratamento em P (kg P ha ⁻¹) = 4,9765 + 42,028x - 7,6103x ²	R ² = 0,09	ns	16
Azevém anual (monocultura)	Tratamento em P (kg P ha ⁻¹) = 33,857 + 112,88x - 249,21x ²	R ² = 0,01	ns	16

x = biomassa aérea (g PS planta⁻¹).

a)



b)

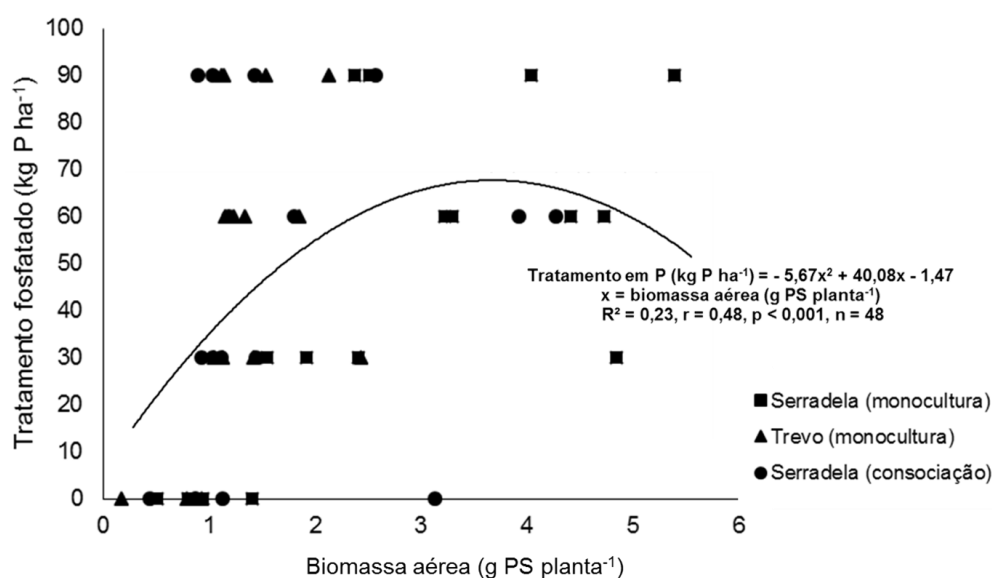


Figura Anexo 3. Regressão polinomial entre os valores da biomassa aérea (g PS planta⁻¹) e o tratamento em P (kg P ha⁻¹) para o azevém anual em consociação a) e para o conjunto das três espécies b) em ambos os sistemas culturais.

ANEXO 4

Quadro Anexo 4: Número dos nódulos rizobianos (n^0), biomassa (mg PS nódulos planta⁻¹), P e N totais (g kg⁻¹ PS), Nda (%) e N₂ fixado (mg N planta⁻¹ (PS)) nos nódulos rizobianos das leguminosas (serradela rosa e trevo subterrâneo), em ambos os sistemas culturais (M= monocultura, C = consociação) e em resposta ao tratamento fosfatado (Trat. Fosfatado = 0, 30, 60, 90 kg P ha⁻¹)

Sistema cultural	Espécie pratense	Trat. Fosf.	Nódulos	Biomassa	P total	N total	Nda	N ₂ fixado
			(n ⁰)	(mg PS planta ⁻¹)	----- (g kg ⁻¹ PS) -----		(%)	(mg N planta ⁻¹ (PS))
M	Serradela	0	65	0,0010	1,21	60,9	87,0	0,0001
M	Serradela	0	274	0,0061	1,21	60,9	87,0	0,0003
M	Serradela	0	130	0,0095	1,21	60,9	87,0	0,0005
M	Serradela	0	194	0,0111	1,21	60,9	87,0	0,0006
M	Serradela	30	349	0,0200	2,11	71,6	93,3	0,0013
M	Serradela	30	449	0,0120	2,11	71,6	93,3	0,0008
M	Serradela	30	237	0,0296	2,11	71,6	93,3	0,0020
M	Serradela	30	434	0,0208	2,11	71,6	93,3	0,0014
M	Serradela	60	185	0,0314	3,07	72,3	93,0	0,0021
M	Serradela	60	507	0,0027	3,07	72,3	93,0	0,0002
M	Serradela	60	471	0,0100	3,07	72,3	93,0	0,0007
M	Serradela	60	672	0,0161	3,07	72,3	93,0	0,0011
M	Serradela	90	395	0,0248	3,08	70,7	92,7	0,0016
M	Serradela	90	616	0,0221	3,08	70,7	92,7	0,0014
M	Serradela	90	271	0,0086	3,08	70,7	92,7	0,0006
M	Serradela	90	246	0,0105	3,08	70,7	92,7	0,0007
M	Trevo	0	26	0,0081	3,7	60,3	86,7	0,0004
M	Trevo	0	24	0,0117	3,7	60,3	86,7	0,0006
M	Trevo	0	25	0,0011	3,7	60,3	86,7	0,0001
M	Trevo	0	19	0,0167	3,7	60,3	86,7	0,0009
M	Trevo	30	158	0,0365	4,31	60,6	85,1	0,0019
M	Trevo	30	44	0,0407	4,31	60,6	85,1	0,0021
M	Trevo	30	44	0,0092	4,31	60,6	85,1	0,0005
M	Trevo	30	33	0,0100	4,31	60,6	85,1	0,0005
M	Trevo	60	44	0,0389	5,22	53	87,3	0,0018
M	Trevo	60	41	0,0265	5,22	53	87,3	0,0012
M	Trevo	60	97	0,0758	5,22	53	87,3	0,0035
M	Trevo	60	102	0,0395	5,22	53	87,3	0,0018
M	Trevo	90	33	0,0480	6,46	63,4	86,4	0,0026
M	Trevo	90	89	0,0267	6,46	63,4	86,4	0,0015
M	Trevo	90	89	0,0624	6,46	63,4	86,4	0,0034

Quadro Anexo 4 (Continuação):

M	Trevo	90	47	0,0307	6,46	63,4	86,4	0,0017
C	Serradela	0	56	0,0218	-	65,3	90,8	0,0013
C	Serradela	0	52	0,0056	-	65,3	90,8	0,0003
C	Serradela	0	89	0,0222	-	65,3	90,8	0,0013
C	Serradela	0	120	0,0195	-	65,3	90,8	0,0012
C	Serradela	30	224	0,0200	-	72,4	96,8	0,0014
C	Serradela	30	60	0,0033	-	72,4	96,8	0,0002
C	Serradela	30	76	0,0100	-	72,4	96,8	0,0007
C	Serradela	30	136	0,0114	-	72,4	96,8	0,0008
C	Serradela	60	60	0,0847	3,54	62,7	97,1	0,0052
C	Serradela	60	57	0,0826	3,54	62,7	97,1	0,0050
C	Serradela	60	86	0,0245	3,54	62,7	97,1	0,0015
C	Serradela	60	170	0,0244	3,54	62,7	97,1	0,0015
C	Serradela	90	182	0,0152	3,48	65,9	96,8	0,0010
C	Serradela	90	276	0,0474	3,48	65,9	96,8	0,0030
C	Serradela	90	138	0,0317	3,48	65,9	96,8	0,0020
C	Serradela	90	103	0,0105	3,48	65,9	96,8	0,0007

- = valores não determinados.

ANEXO 5

Quadro Anexo 5: Teores de P extraível no solo (P ext) e P exportado (P exp) na biomassa radicular (BR), aérea (BA) e nódulos (N), para as espécies pratenses (serradela rosa, trevo subterrâneo e azevém anual) em monocultura (M) e consociadas (C), e para o efeito do tratamento fosfatado (Trat. fosfatado = 0, 30, 60 e 90 kg P ha⁻¹)

Sistema cultural	Espécie pratense	Trat. fosfatado	P ext	P exp (BR)	P exp (BA)	P exp (N)
		(kg P ha ⁻¹)	----- (g P vaso ⁻¹) -----			
M	Serradela	0	0,021	0,00001	0,0012	0,00001
M	Serradela	0	0,017	0,00005	0,0044	0,00004
M	Serradela	0	0,017	0,00003	0,0058	0,00010
M	Serradela	0	0,015	0,00007	0,0049	0,00008
M	Serradela	30	0,024	0,00007	0,0144	0,00034
M	Serradela	30	0,020	0,00005	0,0196	0,00028
M	Serradela	30	0,020	0,00015	0,0219	0,00031
M	Serradela	30	0,019	0,00011	0,0238	0,00035
M	Serradela	60	0,058	0,00021	0,0059	0,00029
M	Serradela	60	0,032	0,00005	0,0349	0,00008
M	Serradela	60	0,032	0,00007	0,0277	0,00031
M	Serradela	60	0,031	0,00014	0,0363	0,00035
M	Serradela	90	0,051	0,00005	0,0390	0,00084
M	Serradela	90	0,062	0,00019	0,0435	0,00041
M	Serradela	90	0,048	0,00005	0,0379	0,00029
M	Serradela	90	0,042	0,00008	0,0467	0,00026
M	Trevo	0	0,016	0,00022	0,0036	0,00009
M	Trevo	0	0,017	0,00012	0,0029	0,00013
M	Trevo	0	0,024	0,00022	0,0037	0,00001
M	Trevo	0	0,013	0,00048	0,0045	0,00012
M	Trevo	30	0,021	0,00052	0,0262	0,00047
M	Trevo	30	0,025	0,00034	0,0150	0,00053
M	Trevo	30	0,032	0,00030	0,0126	0,00012
M	Trevo	30	0,030	0,00057	0,0123	0,00013

Quadro Anexo 5 (Continuação):

M	Trevo	60	0,038	0,00157	0,0312	0,00041
M	Trevo	60	0,035	0,00072	0,0280	0,00041
M	Trevo	60	0,037	0,00173	0,0265	0,00079
M	Trevo	60	0,044	0,00128	0,0218	0,00041
M	Trevo	90	0,074	0,00144	0,0315	0,00062
M	Trevo	90	0,063	0,00064	0,0263	0,00052
M	Trevo	90	0,043	0,00133	0,0378	0,00081
M	Trevo	90	0,060	0,00113	0,0201	0,00040
M	Azevém	0	0,012	0,00001	0,0030	-
M	Azevém	0	0,011	0,00001	0,0035	-
M	Azevém	0	0,011	0,00001	0,0026	-
M	Azevém	0	0,015	0,00000	0,0033	-
M	Azevém	30	0,034	0,00001	0,0064	-
M	Azevém	30	0,030	0,00008	0,0063	-
M	Azevém	30	0,025	0,00003	0,0070	-
M	Azevém	30	0,038	0,00001	0,0076	-
M	Azevém	60	0,048	0,00001	0,0064	-
M	Azevém	60	0,053	0,00001	0,0077	-
M	Azevém	60	0,050	0,00001	0,0068	-
M	Azevém	60	0,055	0,00001	0,0084	-
M	Azevém	90	0,073	0,00002	0,0080	-
M	Azevém	90	0,070	0,00001	0,0084	-
M	Azevém	90	0,079	0,00001	0,0086	-
M	Azevém	90	0,086	0,00001	0,0087	-
C	Serradela + Trevo	0	0,013	0,00002	0,0041	-
C	Serradela + Trevo	0	0,014	0,00002	0,0014	-
C	Serradela + Trevo	0	0,017	0,00002	0,0103	-
C	Serradela + Trevo	0	0,012	0,00007	0,0041	-
C	Serradela + Trevo	30	0,025	0,00007	0,0140	-
C	Serradela + Trevo	30	0,017	0,00027	0,0112	-
C	Serradela + Trevo	30	0,019	0,00005	0,0100	-
C	Serradela + Trevo	30	0,026	0,00082	0,0064	-

Quadro Anexo 5 (Continuação):

C	Serradela + Trevo	60	0,040	0,00473	0,0036	0,00030
C	Serradela + Trevo	60	0,042	0,00430	0,0118	0,00029
C	Serradela + Trevo	60	0,036	0,00025	0,0271	0,00043
C	Serradela + Trevo	60	0,027	0,00012	0,0641	0,00043
C	Serradela + Trevo	90	0,057	0,00034	0,0181	0,00027
C	Serradela + Trevo	90	0,049	0,00022	0,0200	0,00082
C	Serradela + Trevo	90	0,055	0,00027	0,0463	0,00055
C	Serradela + Trevo	90	0,061	0,00016	0,0232	0,00022
C	Azevém	0	0,013	0,00012	0,0008	-
C	Azevém	0	0,014	0,00004	0,0008	-
C	Azevém	0	0,017	0,00005	0,0001	-
C	Azevém	0	0,012	0,00003	0,0016	-
C	Azevém	30	0,025	0,00010	0,0043	-
C	Azevém	30	0,017	0,00010	0,0056	-
C	Azevém	30	0,019	0,00018	0,0030	-
C	Azevém	30	0,026	0,00004	0,0052	-
C	Azevém	60	0,040	0,00007	0,0090	-
C	Azevém	60	0,042	0,00013	0,0071	-
C	Azevém	60	0,036	0,00011	0,0031	-
C	Azevém	60	0,027	0,00069	0,0058	-
C	Azevém	90	0,057	0,00007	0,0064	-
C	Azevém	90	0,049	0,00106	0,0054	-
C	Azevém	90	0,055	0,00005	0,0078	-
C	Azevém	90	0,061	0,00011	0,0057	-

- = valores não determinados.